ORSAY
Série A
N° d'ordre :
915

THESE

présentée

A L' UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

par

Annette TARDIEU

THESE **Etude cristallographique de systèmes lipides-eau**

Soutenue le **21 Mars 1972** devant la commission d'examen

MM A.GUINIER ..... Président

PG.DE GENNES

V.LUZZATI } ..... Examinateurs

ORSAY
Série A
N° d'ordre:
915

THESE

présentée

A L' UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences

par

Annette TARDIEU

THESE **Etude cristallographique de systèmes lipides-eau**

Soutenue le **21 Mars 1972** devant la commission d'examen

MM **A.GUINIER** -------- Président

PG.DE GENNES

V.LUZZATI } ------ Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement M. V. Luzzati qui m'a dirigée, aidée et conseillée tout au long de ce travail. Sa conviction profonde que les lipides sont dignes d'intérêt est en fait à l'origine de cette thèse.

Je remercie M.M. Ephrussi et Slonimski qui m'ont accueillie dans le laboratoire de Génétique Moléculaire.

Je remercie M.M. Guinier et de Gennes qui ont accepté de juger ce travail.

Je tiens à insister sur le fait que ce mémoire est en grande partie une oeuvre collective. Le travail sur les lipides à chaînes liquides est le résultat d'une étroite collaboration avec T. Gulik-Krzywicki ; il a suscité de nombreuses et fructueuses discussions.

L'étude des lécithines synthétiques a pu être réalisée grâce à F. Reman qui a synthétisé ces différents produits et a participé à leur étude.

Je crois que leur contribution à tous deux a été fondamentale, et je les en remercie tout particulièrement.

Je remercie également le Dr. Ververgaert et le Dr. Pinto da Silva pour m'avoir autorisée à reproduire leurs clichés de cryodécapage.

Mme J. Kerboriou a tapé avec dextérité un manuscrit souvent fort peu clair. Elle a droit à toute ma reconnaissance.

Je remercie le personnel technique du laboratoire pour son aide compétente, et tout particulièrement N. Pasdeloup pour avoir préparé avec soin et patience d'innombrables échantillons, et J.C. Dedieu pour m'avoir aidée dans ma lutte contre les appareils de R.X. et pour s'être chargé des photos et graphiques de cette thèse.

Enfin j'exprime ma gratitude à tous ceux qui m'ont fait bénéficier de leur travail, de leurs discussions, et à l'ensemble du personnel du laboratoire pour la sympathie qu'il m'a toujours témoignée, et pour l'atmosphère de camaraderie dans laquelle ce travail a pu être réalisé.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION Page 1

PARTIE EXPERIMENTALE 4

A - EXPERIENCES DE DIFFRACTION DES RAYONS X 4

B - PREPARATIONS DES LIPIDES 6

C - FORMULES CHIMIQUES ET NOMENCLATURE 7

D - VOLUMES SPECIFIQUES 8

ANALYSE DES STRUCTURES 11

A - NOTATIONS ET FORMULES 11

B - CONSIDERATIONS D'ORDRE GENERAL 12

C - ORGANISATION A COURTE ECHELLE 12

D - ORGANISATION A GRANDE ECHELLE 14

E - TAILLE ET CONTENU DES ELEMENTS DE STRUCTURE 14

F - DETERMINATION DES PARAMETRES DE STRUCTURE 15

G - DISTRIBUTION DE LA DENSITE ELECTRONIQUE 16

PREMIERE PARTIE :

ETUDE DE DIFFERENTES PHASES A CHAINES LIQUIDES 17

CHAPITRE I - Article "POLYMORPHISM OF LIPIDS" 18

CHAPITRE II - A) - Article "POLYMORPHISM OF LECITHINS" 21

B) - Additif à l'article 25

CHAPITRE III - A) - STRUCTURE DES PHASES CUBIQUES DES SYSTEMES LIPIDES-EAU Page 27

B) - UNE PHASE CUBIQUE NOUVELLE 31

C) - ADDITIF AUX ARTICLES CONCERNANT LES PHASES A SYMETRIE CUBIQUE 38

DISCUSSION ET CONCLUSIONS 41

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE DE LA LECITHINE D'OEUF ET D'UNE SERIE HOMOLOGUE DE LECITHINES SYNTHETIQUES, DANS LA REGION DU DIAGRAMME DE PHASES OU LES CHAINES PARAFFINIQUES SONT PARTIELLEMENT OU TOTALEMENT ORDONNEES 47

INTRODUCTION 48

CHAPITRE I - ETUDE DE LA REGION HYDRATEE DU DIAGRAMME DE PHASES 51

A) - ETUDE DE LA LECITHINE D'OEUF 51

B) - ETUDE DES LECITHINES SYNTHETIQUES di C2n, 2n 14 53

C) - ETUDE DES LECITHINES SYNTHETIQUES di C2n, 2n 14 72

D) - ETUDE DE LA LECITHINE C10 C18 80

CHAPITRE II - ETUDE DE LA REGION SECHE DU DIAGRAMME DE PHASES 87

A) - PHASE CRISTALLINE 87

B) - PHASE L 100

C) - PHASE P 108

DISCUSSION ET CONCLUSIONS 114

CONCLUSION GENERALE 118

BIBLIOGRAPHIE 121

INTRODUCTION

Les lipides sont des molécules formées d'une partie polaire et d'une partie non polaire, la liaison entre les deux parties étant suffisamment souple pour leur permettre un comportement indépendant. La partie non polaire est généralement formée d'une ou deux chaînes paraffiniques, qui peuvent être de longueur et de degré de saturation différents ; les groupes polaires sont plus hétérogènes.

Les études systématiques par diffraction des rayons X, en fonction de la concentration en eau et de la température, de savons et détergents, puis de lipides d'un intérêt biologique plus direct, ont permis de mettre en évidence un polymorphisme remarquable.

Au moment où nous avons entrepris ce travail on distinguait parmi les structures déjà observées :

- Les phases appartenant à la classe "lamellaire".

Dans cette classe les éléments de structure peuvent être des plans indéfinis organisés dans des réseaux à une dimension, des rubans infiniment longs et de largeur finie organisés dans des réseaux à deux dimensions, ou des disques organisés dans des réseaux à trois dimensions.

- La phase hexagonale, dans laquelle les éléments de structure sont des bâtonnets infiniment longs, parallèles et équidistants, sans corrélations dans le sens de la longueur, organisés latéralement dans un réseau hexagonal à deux dimensions. Cette phase peut être de type I ou II suivant que les bâtonnets sont remplis par les chaînes paraffiniques, ou par l'eau et les têtes polaires.
- La phase cubique dans laquelle les éléments de structure étaient supposés être des sphères.

Dans les phases appartenant à la classe lamellaire, on distinguait également plusieurs configurations des chaînes paraffiniques :

- La configuration de type "liquide".
- Des configurations de type "rigide", présentant un désordre rotationnel, l'organisation dans un plan perpendiculaire aux chaînes étant à symétrie hexagonale.

- Diverses configurations "cristallines".

Deux raisons ont incité un groupe de chercheurs de notre laboratoire à poursuivre l'étude des systèmes lipides-eau :

Une raison "biologique" d'une part. Dans la cellule, les lipides sont spécifiquement localisés dans des structures particulièrement ordonnées, les membranes. Depuis des années des chercheurs s'efforcent d'établir des corrélations entre structure et fonction dans les membranes biologiques, et de définir le rôle des lipides et des protéines et de leurs intéractions, dans la stabilité et le fonctionnement de l'édifice membranaire. Nous avons donc entrepris l'étude cristallographique de systèmes modèles lipides-eau, dans l'espoir que l'expérience et les résultats acquis au cours de l'étude de ces systèmes simples, permettrait d'interpréter une partie au moins des données obtenues dans le cas des membranes.

Une raison plus "physique" d'autre part. Les études précédentes ont mis en évidence un polymorphisme sans équivalent dans aucune autre classe de substances, ainsi qu'un certain nombre de propriétés particulières des systèmes lipides-eau, principalement leur aptitude à former des structures désordonnées à l'échelle atomique et hautement ordonnées à plus long terme. Nous avons donc été tentés d'approfondir l'étude de ces propriétés spécifiques des lipides.

La première partie est consacrée à la détermination de la structure de plusieurs phases à chaînes "liquides", appartenant à de nouvelles classes de structures. Nous insisterons particulièrement sur les phases à symétrie cubique. Ces phases ont été observées tantôt dans des systèmes savon-eau, tantôt dans des systèmes lipides d'origine biologique-eau.

Cette première partie met en relief la similitude de comportement dans de grandes régions du diagramme de phases, de lipides de composition chimique fort différente.

Au contraire dans la seconde partie, nous nous sommes attachés à analyser dans quelles conditions des différences de composition chimique peuvent entraîner des comportements particuliers.

Les lipides d'origine biologique sont généralement très hétérogènes, à la fois en ce qui concerne la nature des groupes polaires, et la longueur et le degré d'insaturation des chaînes paraffiniques, même à l'intérieur d'une même molécule.

La question que nous nous sommes posée avait trait au rôle de l'hétérogénéité au niveau des chaînes, et pour cela nous nous sommes intéressés

aux éventuelles différences de comportement pouvant exister entre un lipide d'origine biologique, la lécithine d'oeuf, et une série homologue de lécithines de synthèse, allant de la lécithine di C8 à di C18. A également été étudiée une lécithine de synthèse possédant deux chaînes paraffiniques de longueur différente, la lécithine C1CC18.

PARTIE EXPERIMENTALE

A - EXPERIENCES DE DIFFRACTION DES RAYONS X

Les lipides sont manipulés dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des microorganismes.

Les échantillons pour l'étude cristallographique sont préparés dans de petits pèse-filtres, par pesée directe des composants (lipides et eau bidistillée), et sont conservés deux ou trois jours à température ambiante, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Ensuite chaque échantillon est transvasé dans une cuve étanche, à fenêtres de mica transparentes aux rayons X ; cette cuve est montée dans un support thermostaté pendant les expériences de diffraction des rayons X. La teneur en eau est parfois vérifiée par analyse (technique de Karl Fischer), sur l'échantillon recueilli après l'expérience de diffraction des rayons X.

Les chambres de diffraction sont du type Guinier, à monochromateur de quartz courbé, opérant sous vide. Les espacements explorés vont de $(300\ \mathring{A})^{-I}$ à $(2\ \mathring{A})^{-I}$. Le rayonnement utilisé est soit la raie $CuK\alpha_I$ (λ = 1,540 $\mathring{A}$), soit la raie $WL\alpha_I$ (λ = 1,476 $\mathring{A}$).

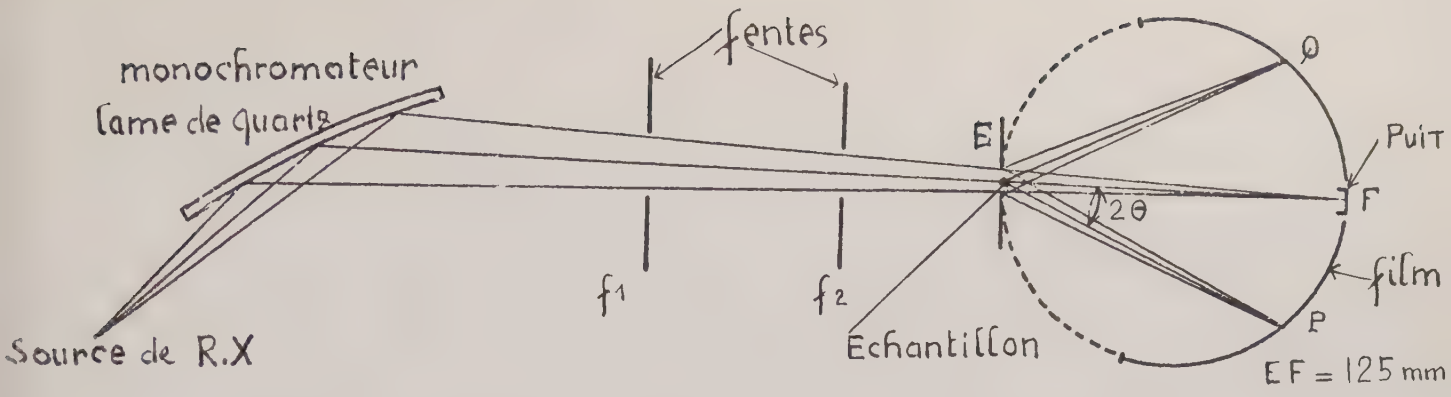
La géométrie des montages utilisés est représentée en Fig. 1.

Les clichés obtenus sont des Debye Scherrer en collimation linéaire.

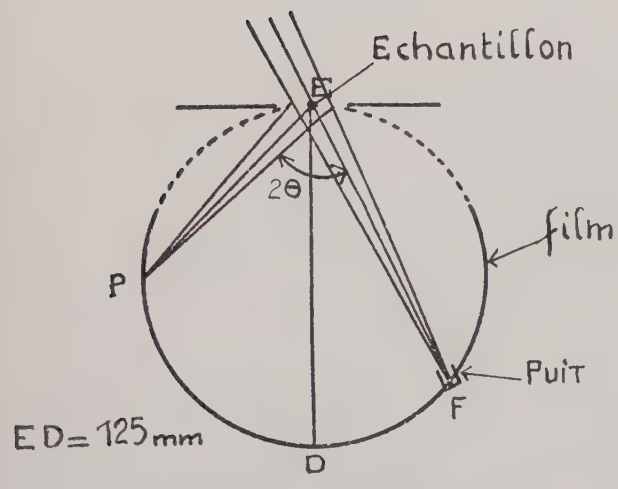
Les seules "nouveautés" expérimentales concernent la mesure des intensités.

Une analyse quantitative précise des clichés n'est sûre que si les échantillons sont des poudres à "grains" très fins et parfaitement désorientés.

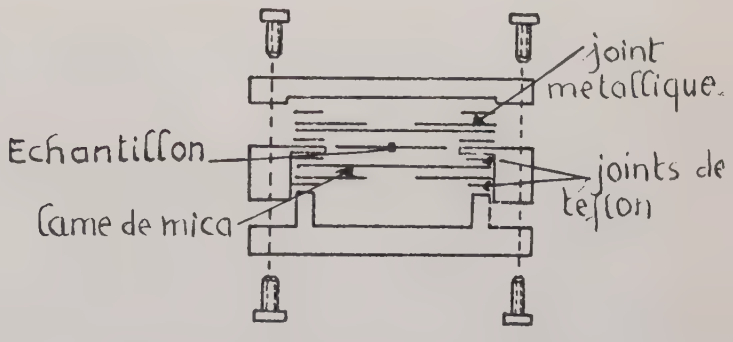
Ces conditions ne sont généralement pas réalisées. Pour tenter d'y remédier, l'échantillon est placé dans un support tournant autour d'un axe perpendiculaire à l'échantillon. Ce simple système permet d'éliminer la ponctuation des raies due à la taille des cristallites, et d'atténuer fortement l'inhomogénéité des raies, due à l'existence d'une orientation préférentielle



Géométrie du dispositif symétrique en projection équatoriale.



Dispositif asymétrique



c Cellule porte échantillon
Coupe transversale

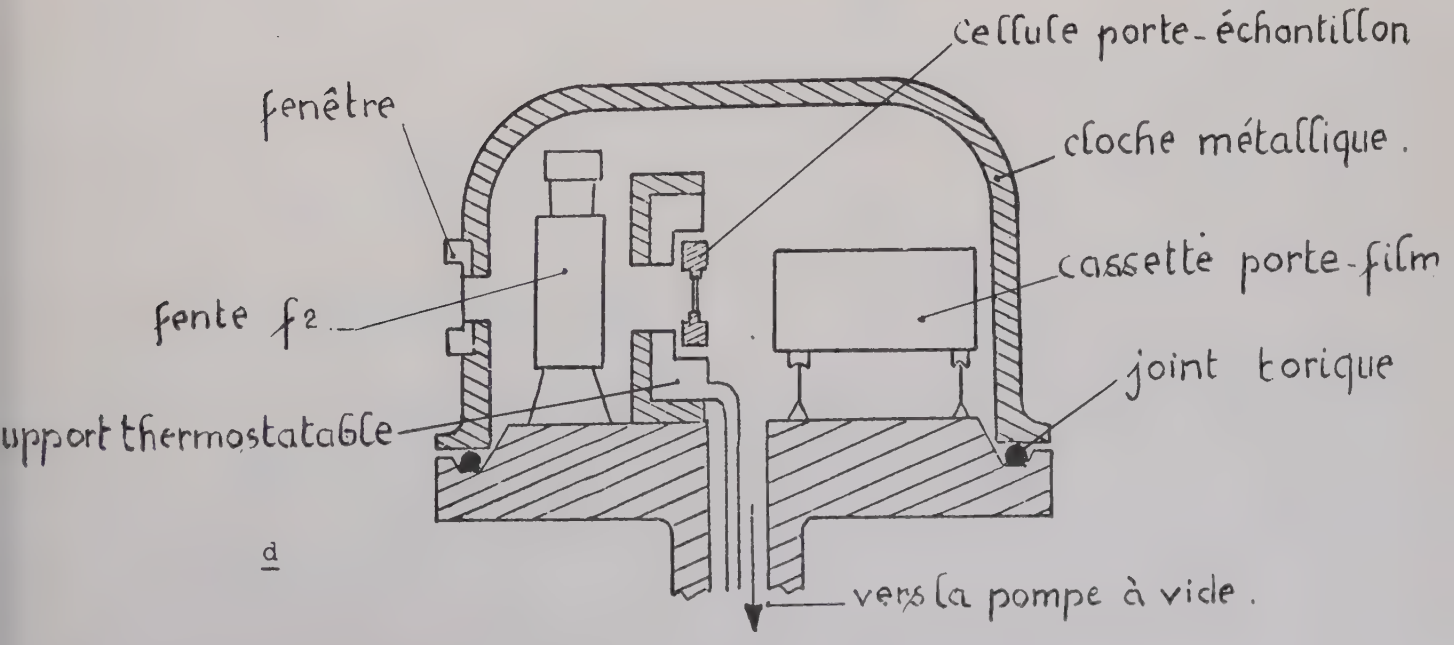


Fig. 1

Caméra : Schéma de la coupe transversale.

Figure extraite de la thèse de C. Monteilhet.

de ces cristallites. Nous avons résolu le problème de la mesure des intensités en collimation linéaire de la façon suivante :

Soit $i_1(s)$ la "forme" d'une raie en collimation ponctuelle et $j_1(s)$ la "forme" de cette raie en collimation linéaire.

Nous supposons le faisceau incident infiniment long et de largeur négligeable devant la largeur de $i_1(s)$, et la raie $i_1(s)$ très étroite autour de s_1.

$$j_1(s) = K_1 \int_0^\infty i_1\left(\sqrt{s^2 + t^2}\right) dt. \qquad (1)$$

Autour de s_1, si pour $t \ll s_1$, $i_1\left(\sqrt{s_1^2 + t^2}\right) \lll i_1(s_1)$

on peut écrire :

$$\sqrt{s_1^2 + t^2} = s_1 + t^2/2s_1$$

Si on fait dans (1) le changement de variable $x = \frac{t^2}{2s}$

on obtient :

$$j_1(s) = K_1 \sqrt{\frac{s_1}{2}} \int_0^\infty i_1(s + x) \frac{dx}{x} \qquad (2)$$

Si toutes les raies ont la même forme $i_1(s)$, $\int_0^\infty i_1(s + x) \frac{dx}{\sqrt{x}}$ a la même forme également autour de chaque position s_1. On peut donc prendre la valeur maximale de $j_1(s)$ autour de s_1, comme mesure de $\left[\sqrt{s_1} \times i_1(s_1)\right]$

Par ailleurs dans la région centrale :

$$i_1(s) = K_2 \frac{I(s)}{s^2} = K_2 \, m \frac{F^2(hkl)}{s^2} \qquad (3)$$

Donc la valeur maximale de $j_1(s)$ est une mesure de $(s_1)^{-3/2} \, mF^2(s_1)$

et

$$m F^2(s_1) = K (s_1)^{3/2} \, j_1(s_1)_{max} \qquad (4)$$

B - PREPARATION DES LIPIDES.

Les savons ont été préparés suivant les techniques décrites par Spegt (1964), Vincent et Skoulios (1966).

La lécithine d'oeuf a été extraite suivant le procédé de Singleton et al (1965).

Les lécithines synthétiques ont été préparées par F. Reman, du Laboratoire du Pr. Van Deenen suivant les méthodes de Baer et Buchnea (1953) de Haas et Van Deenen (1964), et Cubero Robles et de Jongh (1967).

C - FORMULES CHIMIQUES ET NOMENCLATURE :

a) - Savons et détergents

C_n^X : savon saturé. (X est un cation monovalent) :

$$CH_3.(CH_2)_{n-2}COOX$$

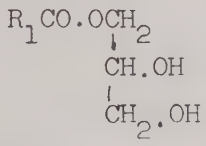
C_nTAB : alkyltriméthylammonium bromide.

$$CH_3(CH_2)_{n-1}N^+(CH_3)_3Br^-$$

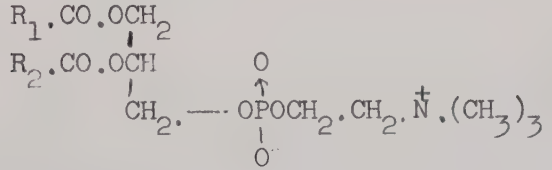
b) - Lipides d'intérêt biologique :

(R_1, R_2, etc. sont les chaînes paraffiniques)

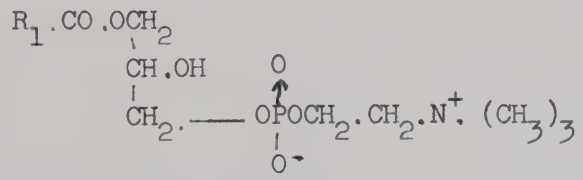
Monoglycérides :



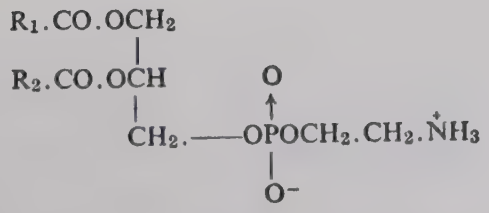
Lécithine : (Phosphatidyl choline)



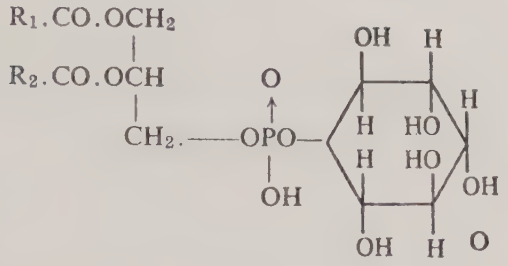
Lysolecithine :



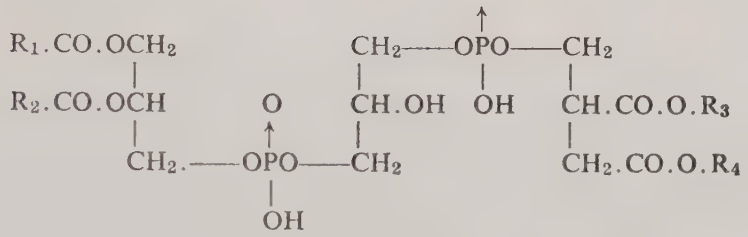
Phosphatidylethanolamine :



Phosphatidylinositol :



Cardiolipides :



D - VOLUMES SPECIFIQUES :

La connaissance du volume spécifique partiel des composants, est essentielle pour la détermination des dimensions des éléments de structure (voir formules page 11).

Pour beaucoup de systèmes, (en particulier pour les savons), les valeurs des volumes avaient déjà été mesurées expérimentalement, et nous avons repris les données de la littérature. Les volumes spécifiques partiels des lécithines synthétiques, n'ont par contre jamais été mesurés, et du fait de la faible quantité de produit disponible, nous n'avons pas cherché à le faire. Leurs valeurs ont été estimées à partir de celles de leurs constituants.

Pour cela nous avons fait deux hypothèses :

- Le volume spécifique partiel d'un composant est indépendant de la composition du système.

- A l'intérieur d'une même molécule, les volumes molaires partiels des constituants sont additifs.

En fait, une étude rigoureuse d'un système à trois composants, (caprylate de sodium, décanol eau, (Mandell et al, 1968)) a montré que le volume spécifique partiel des composants pouvait varier d'une phase à l'autre, et même à l'intérieur d'une même phase. Ces variations ne sont pas toujours

nagligeables, et peuvent être de l'ordre de 2 à 3% ; faute de données, nous nous sommes néanmoins limités aux hypothèses ci-dessus, et dans tous les cas où la détermination de certains paramètres structuraux apporte un soutien décisif à un modèle de structure, nous avons vérifié que de telles variations n'auraient pu changer les conclusions.

Les volumes spécifiques partiels des diverses lécithines synthétiques dans la phase Lα ont été calculés comme suit :

Le volume spécifique partiel de la lécithine d'oeuf est connu : $v = 0,987\ cm^3 gr^{-1}$ à 25°. (Reiss-Husson, 1967). La composition en chaînes paraffiniques ainsi que les volumes des groupements CH, CH2, CH3, sont connus (Reiss-Husson et Luzzati, 1964) vCH = 20,5 $\AA^3$, vCH2 = 27 $\AA^3$, vCH3 = 54 $\AA^3$, ce qui permet de déterminer vpol = 360 $\AA^3$.(Dans ces calculs, vpol comprend les groupes glycérophosphorylcholine, plus les groupements carboxyliques). Les volumes spécifiques de chacune des lécithines synthétiques peuvent alors être calculés. Les valeurs obtenues sont données en table I.

Le volume spécifique à la température t sera donné par la relation $v_t = v_{25}\ (I+0,000748dt)$ (voir Luzzati et Spegt, 1967). Dans les phases à chaînes paraffiniques rigides Lβ et Lβ', vCH2 est connu et est égal à $1,25\ (4,2)^2\ 2/\sqrt{3} = 25,5\ \AA^3$. Ce qui revient à multiplier les valeurs de vCH2 dans la phase à chaînes liquides par 0,945. On admettra que ce coefficient est également valable pour vpol et vCH3, d'où, vpol = 340 $\AA^3$, VCH2 = 25,5 $\AA^3$, vCH3 = 51 $\AA^3$.

Ces phases ne peuvent généralement être étudiées que dans un domaine restreint de température, de l'ordre de 20°C environ, et dans ces conditions nous n'avons pas observé par rayons X de variation des paramètres des mailles ; aussi nous admettrons que ces valeurs des volumes spécifiques sont indépendantes de la température.

On peut enfin remarquer que dans certaines phases, (L δ ,C) les volumes spécifiques, peuvent être déterminés à partir des données cristallographiques. Le volume spécifique d'une lécithine dans la phase L δ a ainsi été trouvé identique au volume spécifique calculé d'une lécithine dans une phase de type β ou β'.

TABLE I - VOLUMES SPECIFIQUES DES DIFFERENTES LECITHINES DANS LES PHASES A CHAINES LIQUIDES (Lα) ET A CHAINES RIGIDES (Lβ, Lβ').

		Lα		Lβ, Lβ'
Composé	P M	T (°C)	$\bar{v}$ (cm^3/g)	$\bar{v}$ (cm^3/g)
di C10 lec	566	25°C	0.957	0.905
di C12	622	25°C	0.975	0.922
di C14	678	25°C	0.989	0.935
di C16	734	45°C	1.018	0.948
di C18	790	75°C	1.050	0.958

ANALYSE DES STRUCTURES

A - NOTATIONS ET FORMULES

$s = 2 \sin \theta / \lambda$ — espacement réciproque $(A°)^{-1}$, 2θ est l'angle de diffraction, λ est la longueur d'onde.

h, k, l, — indices des réflexions.

$\mathcal{N}$ — Nombre d'Avogadro

M — masse molaire des lipides, dans un mélange M est la moyenne en poids.

c — concentration pondérale (lipide/lip. + eau)

$\bar{v}_1$, $\bar{v}_o$ — volumes spécifiques partiels des lipides et de l'eau, $(cm^3 g^{-1})$

$\Phi = \left[1 + \bar{v}_o (1-c)/\bar{v}_1 c\right]^{-1}$ — concentration volumétrique

S — surface moyenne dont dispose chaque groupe polaire à l'interface lipide-eau $(A°^2)$

Phase lamellaire

d — période de la maille à une dimension (A°)

$s = 1/d$ — espacement des raies de diffraction : on appellera "réflexions lamellaires" des réflexions dont les espacements sont dans le rapport 1, 2, 3, 4...

$d_1 = d\Phi$ — épaisseur de la couche lipidique fictive qu'occupent les lipides d'une maille sans eau. (A°).

$d_o = d - d_1$ — épaisseur de la couche d'eau (A°).

$N_I = d_1 \mathcal{N} 10^{-24} / M\bar{v}_1$ — nombre de molécules de lipide par unité de surface d'une maille élémentaire (moles/$A°^2$).

$S = 2/N_I$

B - CONSIDERATIONS D'ORDRE GENERAL

Lorsqu'on aborde l'étude, par diffraction des rayons X, d'un système à plusieurs composants, il convient de reconnaitre, avant tout, les différentes phases, et de délimiter leurs domaines d'existence, (ce qui équivaut formellement à construire le diagramme des phases), pour entreprendre ensuite la détermination des structures.

Du fait de la propriété de ces systèmes, de présenter des structures ordonnées à longue échelle, (50 à 200 $\mathring{A}$ env.) mais qui peuvent être fortement désordonnées à l'échelle atomique, on distingue dans un cliché de rayons X deux régions :

a) - La région des "petits angles", $s < 0,1 \mathring{A}^{-1}$, qui contient les informations sur la type et la symétrie des réseaux, c'est à dire sur l'organisation à grande échelle.

b) - La région des "grands angles", $s \simeq 0,25 \mathring{A}^{-1}$, qui contient les informations à courte échelle, notamment sur la conformation des chaînes paraffiniques.

Nous allons expliciter ceci (voir ci-dessous).

C - ORGANISATION A COURTE ECHELLE : CONFORMATION DES CHAINES PARAFFINIQUES

Dans les systèmes décrits ici, les chaînes paraffiniques adoptent différents types de conformation qui se caractérisent dans les diagrammes de diffraction des rayons X, par la présence de raies et de bandes plus ou moins diffuses dans une région comprise entre $s = (5 \mathring{A})^{-1}$ et $s = (2 \mathring{A})^{-1}$. Généralement seules les chaînes contribuent à la diffraction dans cette région, qu'on appellera donc par la suite "région des chaînes paraffiniques".

Les différents types de conformation observés sont les suivants :

a) - La conformation chaotique de type liquide, qui se caractérise par la présence, dans les diagrammes de diffraction des rayons X, d'une bande diffuse, autour de $s = (4,5 \mathring{A})^{-1}$, analogue à la bande des paraffines liquides. A l'origine le désordre des chaînes a été confirmé par le fait que certaines dimensions des éléments de structure diminuent lorsque la température s'élève, (Luzzati et al, 1960 ; Luzzati et Husson, 1962, Luzzati, 1967) et par des études par infra rouge (Chapman, 1958; Chapman, 1968).

Les rayons X ne permettant pas de différencier le désordre "spatial" du désordre "temporel", la "conformation chaotique" englobe des conformations très différentes au point de vue de la mobilité. Les degrés de liberté des chaînes dans différentes phases ont fait l'objet d'études par d'autres techniques, (infra-rouge, analyse thermique différentielle) et sont surtout étudiées actuellement par NMR, et avec l'utilisation de sondes, par RPE et fluorescence. Dans la suite de l'exposé, le problème posé étant surtout celui de la détermination de la structure d'un certain nombre de phases à chaînes "liquides", nous nous limiterons aux données de rayons X.

b) - Les structures rigides

1) - à symétrie hexagonale, caractérisée par la présence dans la région comprise entre $s = (5\ \mathring{A})^{-1}$ et $s = (3\ \mathring{A})^{-1}$, d'une seule raie fine, voisine de $s = (4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$. Cette raie a été attribuée par Müller (1932) aux paraffines rigides et étirées, présentant un "désordre rotationnel" autour de leur axe et organisées latéralement selon un réseau hexagonal à deux dimensions ; Vincent et Skoulios (1966) ont mis en évidence ce type de structure dans les savons ; Gulik et al (1967) ont confirmé la symétrie hexagonale par l'observation des raies à $s_2 = \sqrt{3}\ s_I$ et à $s_3 = 2s_I$. (Phase L_β). Un paramètre relatif à ce mode d'organisation, auquel nous nous référerons par la suite, est la surface dont dispose chaque chaîne dans un plan perpendiculaire à son axe, c'est à dire la surface de la maille élémentaire à deux dimensions, $\Sigma = (4{,}2)^2\ 2/\sqrt{3} = 20{,}4\ \mathring{A}^2$. Les chaînes sont ici perpendiculaires au plan du feuillet et S (surface par tête polaire) = 2Σ.

2) - à symétrie hexagonale, caractérisée par la présence d'une raie fine et d'une raie plus large autour de $s = (4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$. L'organisation des paraffines est la même que dans le cas précédent, mais les axes des chaînes font un angle non nul avec la normale au plan du feuillet, et $S \neq 2\Sigma$. (Phases L β', P β').

3) - à symétrie quadratique, caractérisée par la présence d'une raie fine à $s_I = (4{,}8\ \mathring{A})^{-1}$, suivie de deux raies à $s_2 = \sqrt{2}\ s_I$ et $s_3 = 2s_I$. (Phase L δ). Ces réflexions ont été attribuées aux paraffines rigides, enroulées en hélice, (voir plus loin) et organisées latéralement selon un réseau quadratique à deux dimensions. La surface dont dispose chaque chaîne dans un plan perpendiculaire à son axe, c'est à dire la surface de la maille élémentaire à deux dimensions $\Sigma = (4{,}8)^2 = 23\ \mathring{A}^2$. Les chaînes sont ici perpendiculaires au plan du feuillet et $S = 2\Sigma$.

4) - dans la structure cristalline il existe un ordre périodique à 3 dimensions, nous y reviendrons.

5) - des cas intermédiaires peuvent exister, dans lesquels la conformation des paraffines varie le long de la chaîne. (Phase P $\mathcal{J}$).

D - ORGANISATION A GRANDE ECHELLE ; TYPE ET SYMETRIE DES RESEAUX.

Les phases décrites ici dont la structure peut être hautement désordonnée à l'échelle atomique, présentent à une échelle nettement plus grande, une organisation strictement périodique, à I, 2, ou 3 dimensions.

Les structures observées peuvent être réparties en deux classes principales :

a) - la classe lamellaire.

Les éléments de structure sont des lamelles qui peuvent être infinies dans deux directions, et organisées dans un réseau périodique à une dimension, ou des rubans infiniment longs et de largeur finie, (ou des lamelles présentant une déformation périodique), organisés dans des réseaux à deux dimensions, ou des disques organisés dans des réseaux à 3 dimensions.

b) - la classe "en bâtonnets".

Les éléments de structure sont des bâtonnets qui peuvent être infiniment longs, organisés dans un réseau hexagonal à deux dimensions, ou de longueur finie, reliés trois à trois ou quatre à quatre pour former divers réseaux tridimensionnels.

Il faut remarquer ici, que des éléments de structure "en bâtonnets", impliquent un ordre à courte échelle de type "chaotique", alors que des éléments de structure en "lamelles", peuvent incorporer aussi bien des chaînes paraffiniques chaotiques, que rigides.

E - TAILLE ET CONTENU DES ELEMENTS DE STRUCTURE.

Si on tient compte des propriétés chimiques des systèmes lipide-eau, on peut envisager d'autres critères de classification des structures.

Les structures sont simples ou complexes selon que les éléments, formés d'aggrégats de molécules lipidiques, ont une forme simple, ou bien sont des associations de plusieurs éléments (voir l'exemple des phases Lβ et L γ plus loin).

Lorsque la forme des éléments de structure est telle qu'on peut distinguer le volume intérieur du volume extérieur (c'est le cas, par exemple, de la phase hexagonale), deux types de structures sont possibles : le type I, si les chaînes paraffiniques se trouvent à l'intérieur et le milieu polaire à l'extérieur, type II dans le cas contraire. Pour faire le choix entre ces deux types de structures il faut évidemment s'appuyer sur d'autres données expérimentales que celles fournies par la diffraction des rayons X (voir plus loin le cas de la phase hexagonale).

F - DETERMINATION DES PARAMETRES DE STRUCTURE.

Les données expérimentales relatives à chaque phase sont un ensemble de réflexions, obtenues en général sans orientation. On reconnaît le type et la symétrie du réseau d'après les rapports des espacements (voir plus haut). Lorsque la symétrie est connue, on peut déterminer les dimensions de la maille élémentaire.

Si on connaît également la concentration et le poids moléculaire des lipides, ainsi que les volumes spécifiques partiels des lipides et de l'eau, on peut déterminer le nombre N de molécules lipidiques contenues dans une maille élémentaire (voir plus haut).

Pour avancer plus loin dans l'analyse des structures il est nécessaire de faire quelques hypothèses. Une première, déjà tacitement admise, est que les chaînes paraffiniques se trouvent rassemblées dans des régions d'où l'eau est exclue, et que l'interface eau-paraffine est couverte par les groupes hydrophiles des molécules lipidiques. Dans ce cas la surface S dont dispose en moyenne un groupe hydrophile à l'interface eau-paraffine est un paramètre défini sans ambigüité. Une deuxième hypothèse est que la forme des éléments de structure possède une symétrie élevée, même si celle-ci n'est pas exigée par la symétrie de la maille (Luzzati & Reiss-Husson, 1966) ; ainsi dans la phase hexagonale on admettra que les bâtonnets sont des cylindres à section circulaire. Ces hypothèses faites, il est possible de déterminer plusieurs paramètres dans chaque phase (voir plus haut).

G - DISTRIBUTION DE LA DENSITE ELECTRONIQUE.

L'étape suivante est l'analyse de la distribution de la densité électronique.

Dans ce travail, une seule approche a été utilisée, à partir des paramètres connus, nous avons cherché dans chaque cas, un modèle qui rende compte de l'intensité des raies de diffraction observées. Nous décrirons plus loin le choix des modèles et le calcul des intensités.

Nous avons, par cette approche, été amenés à développer l'utilisation de toutes les données chimiques, à préciser les hypothèses raisonnables pour de tels systèmes.

Dans tous les cas, les modèles utilisés ont été des fonctions créneaux, et ces modèles très simples, ont toujours permis de rendre compte des intensités observées de manière satisfaisante.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE DIFFERENTES PHASES A CHAINES PARAFFINIQUES LIQUIDES.

CHAPITRE I : POLYMORPHISME DES LIPIDES.

(Reprinted from *Nature*, *Vol.* 217, *No.* 5133, *pp.* 1028–1030, *March* 16 1968)

Polymorphism of Lipids

by
VITTORIO LUZZATI
A. TARDIEU
T. GULIK-KRZYWICKI
Centre de Génétique Moléculaire,
CRNS, Gif-sur-Yvette, France

The structures of two new phases of divalent cation soaps have been solved. The polar groups (cations and carboxyl groups) form planar two-dimensional networks, either square or hexagonal, embedded in a continuous matrix formed by the disordered paraffin chains. These and earlier results make possible a unified picture of a novel class of structures in all of which the polar groups are clustered in rod-like regions, but which differ in the way the rods are arranged in one, two or three-dimensional networks.

THE work described here arose from the casual observation of striking structural analogies between the high-lipid, high-temperature phases of lecithin–water systems and the anhydrous high-temperature phases of several divalent cation soaps. This observation has led to an analysis of the literature, to the reinterpretation of some of the published data, and in some cases to new experiments. The result has been the discovery of a novel family of structures, formed by identical rod-like elements, which are ordered into either two or three-dimensional lattices. The "structure elements", to which we often refer in this article, are by definition the locus of the polar groups; those elements are embedded in a paraffin matrix in which the electron density is supposed to be uniform throughout. The structures observed with soaps are described here: the lecithins will be discussed later.

Spegt and Skoulios studied many anhydrous soaps of the divalent cations of group II as a function of temperature, using X-ray diffraction techniques[1–4]. Many of the data used here come from that work: when new experiments were carried out, the techniques were those described by Spegt and Skoulios. A few examples of the phase diagrams established by these authors are given in Table 1. The low-temperature phases C_1 and C_2 are lamellar, with stiff paraffin chains; the conformation of the chains in all the other phases is disordered, as shown[5] by the presence of a diffuse band near $s = (2 \sin \theta/\lambda) = (4{\cdot}5\ \text{Å})^{-1}$. Phases H, T, R, Q are each characterized by a number of sharp small-angle reflexions. Phases H, H_1 and H_2 are two-dimensional hexagonal arrays of rigid rods, the rods containing the polar groups of the soaps. Spegt and Skoulios have shown that the number n of cations per unit length of rod, a parameter easily determined for this type of structure, is constant for all the soaps of the same cation[1–4]. When two hexagonal phases (H_1 and H_2) are observed in one soap, each phase is characterized by a different value of n (refs. 1 and 4). Phase Q is body-centred cubic[3]; its structure[6] consists of rods of finite length, linked three by three, and forming two interwoven three-dimensional networks (ref. 6, Fig. 2). The distribution of the cations seems to be uniform along the rods, with the exception of a short gap (approximately 1·5 Å long), devoid of cations, near the ends. In this structure the number n is the same for all the strontium soaps; furthermore, n is almost identical in phases Q and H (ref. 6 and Table 2).

Here we are mainly concerned with the structure of phases T and R. Spegt and Skoulios have indexed the small-angle reflexions of both phases on two equatorial planes; assuming arbitrarily that the two planes are at right angles they propose a face-centred orthorhombic lattice for phase T (ref. 2), and a face-centred monoclinic lattice for phase R (ref. 3). In fact, an inspection of the data shows that for all the soaps and at all temperatures the spacings of the reflexions are in perfect agreement with a body-centred tetragonal lattice for phase T ($a/c = \sqrt{2}$ in Tables 3 and 4 of ref. 2), and with a rhombohedral lattice

Table 1. PHASE DIAGRAMS OF THE ANHYDROUS STEARATES OF THE CATIONS OF GROUP II

Mg^{1}	C_1 or C_2 (109°) H_1 (195°) H_2 (210°) melt
Ca^{2}	C_1 (100°) C_2 (123°) T (152°) . . . (179°) H (> 350°)
Zn^{1}	C_1 (130°) melt
Sr^{3}	C_1 (130°) . . . . (170°) R (197°) Q (246°) H (> 400°)
Cd^{4}	C_1 (99°) H_1 (211°) H_2 (~ 230°) melt
Ba^{1}	C_1 (150°) . . . . (220°) Q (> 400°)

Transition temperatures are given in parentheses. The dotted lines show regions in which the phases have not been fully characterized. The phase diagrams of the other saturated soaps of the same cation are quite similar to stearate (see refs.), although the phase T was observed recently in strontium arachidate, near 170° C (unpublished results). The correspondence of the nomenclature adopted here with that of Spegt and Skoulios is the following: for the calcium soaps T and H replace D and F; for the strontium soaps R replaces A; for the cadmium soaps H_1 and H_2 replace B and C.

Table 2. SOME DATA ON THE STRONTIUM SOAPS

	Phase R						Phase Q			Phase H	
	t °C	δ g cm^{-3}	a Å	c Å	N	n	t °C	N	n	t °C	n
Laurate	180	0·91$_6$	29·0	78·0	21·4	0·52$_4$	235	215	0·51$_1$	265	0·49$_6$
Myristate	180	0·89$_3$	31·0	84·8	23·3	0·52$_5$	235	233	0·51$_0$	265	
Palmitate							235	248	0·50$_0$	265	
Stearate	181	0·87$_2$	36·0	93·3	28·0	0·52$_8$	235	261	0·50$_7$	265	
Arachidate*	200	0·85$_0$	37·9	97·5	29·3	0·52$_1$	235	278	0·50$_4$	265	
Behenate							235	285	0·50$_0$	265	

The structures of phases R and Q are shown in Fig. 1 and in ref. 6, Fig. 2. The parameters a and c of the hexagonal cell were deduced from the parameters c', b' and γ' of the face-centred monoclinic cell of ref. 3 ($a = 2c'$; $c = 3/2.b'.\sin \gamma'$), and were verified with new experiments. (The density δ is determined as in ref. 6, Table 2.) $N = 0{\cdot}602\ V\delta/M$ is the number of cations associated with one lattice point (V, volume of the elementary cell; M, molecular weight of the soap). The symbol n is the number of cations per unit length of rod: $n = N/3(D-d)$, where $D = a/\sqrt{3}$ is the length of one side of the hexagon, $d/2 = 1{\cdot}56$ Å is the length of the gap devoid of cations, at each end of the rods. The dimensions of phases Q and H are taken from refs. 3 and 6.

* See comment in Table 1.

Table 3. SOME DATA ON THE CALCIUM SOAPS

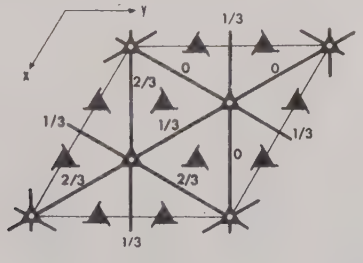
	Phase T						Phase H	
	t °C	δ g cm^{-3}	a Å	c Å	N	n	t	n
Laurate							240	0·52$_9$
Myristate	165	0·89$_0$	31·7	55·0	30·1	0·58$_5$	240	0·52$_9$
Palmitate	159	0·88$_5$	34·1	59·1	33·2	0·59$_0$	240	0·53$_4$
Stearate	152	0·88$_0$	35·9	62·2	35·1	0·58$_7$	240	0·53$_4$
Arachidate	152	0·87$_5$	38·3	66·4	38·7	0·59$_0$	240	0·53$_4$

The structure of phase T is shown in Fig. 2. The parameters a and c are taken from ref. 2, Table 4 (c here is b in ref. 2), and were verified with new experiments. N is determined as in Table 2, with δ given in ref. 2. $n = \frac{N}{2(D-d)}$, $D = a$, $d/2 = 3$ Å. The lattices are pseudo-hexagonal ($c = \sqrt{3}\ a$) at the temperature of Table 3. The data of ref. 2 permit calculation of N and n at different temperature, for calcium myristate: the results are the same as in the table. The value n of phase H is taken from ref. 2.

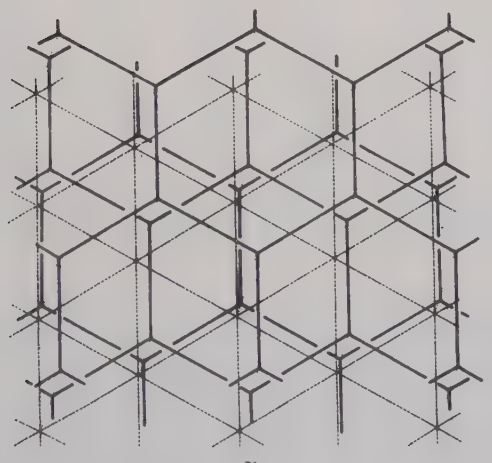
for phase R ($a/c = \sqrt{3}$ and $\cos\gamma \simeq a/3b$ in Table 3 of ref. 3); these lattices will be adopted here, on the ground that the number of independent parameters is minimal (two for the tetragonal and rhombohedral, instead of three for the orthorhombic and four for the monoclinic). The agreement of the observed and calculated spacings is shown in Tables 4 and 5.

By analogy with phases H and Q we propose that phases T and R are ordered arrangements of identical rod-like elements of finite length. The structures are represented in Figs. 1 and 2: the rods are linked together four by four in phase T, three by three in phase R, and form planar two-dimensional networks, either square or hexagonal. These structures explain the observations in a far more satisfactory manner than the structures formed by disk-shaped structure elements, as suggested before (ref. 2, Fig. 5).

Observed and calculated intensities agree very well for the rod-like structures of Figs. 1 and 2 (Tables 4 and 5), if, as in phase Q of the strontium soaps[6], the distribution

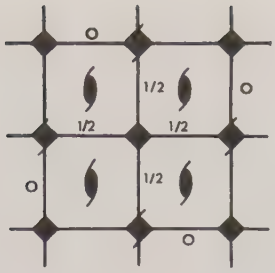


A

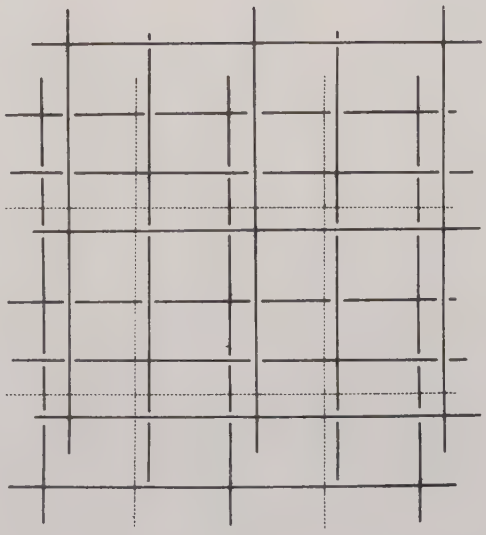


B

Fig. 1. Phase R: space group $R\bar{3}m$. The loci of the polar groups, represented by heavy lines, are rods of finite length that sit on mirror planes. The rods are linked three by three, forming planar two-dimensional networks. *A*, Projection of one unit cell along the hexagonal axis, with the position of some of the symmetry elements. The rods are perpendicular to the c axis: the fractional figures are the z co-ordinates of the rods. *B*, Perspective view. Note the two-dimensional hexagonal networks, stacked and mutually unconnected.



A



B

Fig. 2. Phase T: space group $I422$ (see legend of Fig. 1). The polar groups sit on two-fold axes. *A*, Projection of one unit cell along the tetragonal axis c. The rods are parallel to the plane a, b; the fractional figures are the z co-ordinates of the rods. *B*, Perspective view. Note that the structure is formed by identical rod-like elements, linked four by four, forming two-dimensional planar square networks. The networks are stacked, otherwise unconnected.

of the cations is uniform along the rods*, with the exception of a short gap at the ends, devoid of cations. It should be noted, nevertheless, that for disk-shaped structure elements the agreement would not be much worse, as long as the size and shape of the disks are properly adjusted; different soaps of the same cation should be compared if the intensity distribution were to provide a discrimination between rods and disks (this problem will be discussed elsewhere).

More direct arguments in favour of the rod-like structures can be obtained from analysis of the dimensions of the structure elements. Tables 2 and 3 show the following: (*a*) In each phase (T, R, Q, H) n is constant for all the soaps of the same cation. (*b*) In the strontium soaps n has almost the same value in the three phases R, Q and H; the small differences between the phases T and H of the calcium soaps are of the same order as those observed between the phases H_1 and H_2 of the magnesium and cadmium soaps[1,4], and can be similarly explained, as discussed here. (*c*) At high temperature, the lattices of phase T of all the calcium soaps become pseudo-hexagonal[2] (Table 3), a consequence of the fact that each of the bundles of rods parallel either to the a or to the b axis becomes a two-dimensional hexagonal array.

Clearly all these numerical coincidences would be meaningless if the structure elements were assumed to

* The uniform distribution of the cations must be taken as a simplification justified by the low resolution of the X-ray data ($s^{-1} > 8$ Å, see Tables 4 and 5

Table 4. X-RAY DIFFRACTION DATA OF PHASE R: STRONTIUM MYRISTATE, 185° C

hkl	s_{obs} $(10^3$ Å$)^{-1}$	s_{calc} $(10^3$ Å$)^{-1}$	I_{obs}	I_{calc}	F
000					+44·0
003	35·8	36·0	1,500	1,313	+44·0
101	39·5	39·4	459	397	−17·7
012	44·7	44·6	261	341	−17·7
104	60·7	60·9	55	172	−17·7
110	65·4	65·0	21	14	+8·5
015	69·9	70·7	27	104	−17·7
006	71·7	72·0	321	331	+44·0
113	74·1	74·2	20	17	+8·5
021	75·9	75·9	10	17	+15·9
202	79·9	78·9	9	15	+15·9
024	—	89·1	<8	7	+15·9
107	91·9	92·0	26	28	−17·7
205	96·3	96·0	18	5	+15·9
116		97·0		4	+8·5
211		99·6		1	−10·9
122	102·5	101·8	25	1	−10·9
108		103·2		12	−17·7
009	107·9	108·2	72	35	+44·0
214	—	110·0	<10	<1	−10·9
300	—	112·5	<10	<1	−9·5
027	—	112·5	<10	<1	+15·9

The X-ray pictures were recorded on a Guinier camera. The values s_{obs} and s_{cal} are the reciprocal spacing ($s = 2 \sin \theta/\lambda$) of the observed reflexions, and calculated for the hexagonal lattice (space group $R\bar{3}m$), with $a = 30{\cdot}8$ Å, $c = 83{\cdot}3$ Å. Values of I_{obs} are the observed intensities; strong intensities were measured on densitometer tracings, and weak ones were estimated visually by recording the X-ray pictures on packs of films and comparing different films (the absorption coefficient of which is known). The intensities were corrected for the proper geometric factor. The calculated intensities can be expressed as follows:

$$I_{calc} = m\ F^2 \exp\left[-as_l^2 - \beta\,(s^2 - s_l^2)\right]$$

m is the multiplicity factor; F is the structure factor, normalized to $F_{000} = 3(D-d)$ (that is, the total length of rods in one elementary cell); the gaussian function (s_l is the l component of s) takes into account several effects, such as the anisotropic thermal motion, the spread of the electron density around the axis of the rods, the scattering of the length of the rods (in Tables 2 and 3 n is not an integer). The structure factors are those of space group $R\bar{3}m$, special positions (x, $x/2$, 2/3, and so on . . .), integrated over the length of the rods (ref. 10, page 472); the gap at the end of the rods is taken into account in the form of a delta function, at (0, 0, 2/3):

$$F_{hkl} = D/4 \int_0^{1/3} A_{hkl}\,(x,\ x/2,\ 2/3)\ \mathrm{d}x - 3d$$

The result is $F_{00l} = 3\,(D-d)$; $F_{hk1} = D-d$; $F_{hkl} = 3D/\pi\,[(2h+k)^{-1} + (k-h)^{-1} - (h+2k)^{-1}]\ \sin\ 2\pi l/3 - 3d\ \cos\ 2\pi l/3$. The parameters used in the calculations are: $D = 17{\cdot}8$ Å; $d = 3{\cdot}12$ Å; $\alpha = 310$ Å^2; $\beta = 680$ Å^2.

Table 5. X-RAY DIFFRACTION DATA OF PHASE T: CALCIUM STEARATE, 140° C

hkl	s_{obs} $(10^3$ Å$)^{-1}$	s_{calc} $(10^3$ Å$)^{-1}$	I_{obs}	I_{calc}	F
000					+58·4
002	30·9	30·9	3,650	4,240	+58·4
101	32·4	32·3	4,730	3,370	+23·2
110	40·3	40·2	385	151	−12·0
112	50·5	50·6	150	187	−12·0
103	54·2	54·3	742	1,310	+23·2
200	56·8	56·8	161	163	+23·2
004	61·8	61·8	666	1,060	+58·4
202	64·9	64·6	205	202	+23·2
211		65·3		77	−12·0
114	—	73·6	<60	47	−12·0
213	—	78·6	<60	33	−12·0
220	—	80·3	<60	3	−12·0
105	82·2	82·3	204	205	+23·2
204	—	83·9	<60	51	+23·2
222	—	86·0	<60	4	−12·0
301	—	86·6	<60	11	+23·2
130	—	89·8	<60	2	−12·0
006	92·6	92·7	163	100	+58·4
303	—	96·9	<70	45	+23·2

Experiments and calculations were carried out according to the legend of Table 4. Space group $I422$, $a = 35{\cdot}2$ Å, $c = 64{\cdot}7$ Å. The structure factors take the form: $F_{00l} = 2(D-d)$; $F_{h0l} = D-2d$; $F_{hkl} = -2d$. The parameters are: $D = 35{\cdot}2$ Å; $d = 6$ Å; $\alpha = 490$ Å^2; $\beta = 810$ Å^2.

be disk-shaped; furthermore, the number of cations per disk (N in Tables 2 and 3) would vary with the length of the paraffin chain, and the high temperature form of phase T would be an odd pseudo-hexagonal organization of flat disks parallel to the "six-fold" axis.

Other properties are consistent with the rod-like structures. Fairly large crystals are observed in phase Q much more frequently than in any other phase: this property should be correlated with the presence of the three-dimensional network. Phases R and T can be visualized as lamellar structures, with stronger cohesion in the plane of the lamellae than between lamellae, and can be expected to display order–disorder phenomena whenever the interlamellar correlations become sufficiently loose. Spegt and Skoulios[1-3] mention phenomena of that nature, characterized by the presence of both sharp and diffuse small-angle reflexions (these phenomena will be discussed elsewhere).

The most satisfying result emerging from the variety of structures described here is perhaps that one can construct a unified picture embodying them all. Indeed, it is now clear that the high temperature phases of the anhydrous soaps of the divalent cations of group II are all constructed according to the same principle. The polar groups are clustered in rod-like regions, and the rods, all identical and crystallographically equivalent, are organized in either a two or three-dimensional lattice. Structure H consists of infinitely long isolated rods (one-dimensional network) arranged in a hexagonal two-dimensional lattice; structures R and T consist of rods of finite length, linked three by three or four by four, respectively, forming two-dimensional hexagonal or rectangular networks, which are stacked regularly into three-dimensional lattices. Structure Q consists of rods joining three by three, and forming two interwoven three-dimensional networks. This class of structures has been discussed by Wells[7]; all the structures discussed in this article were considered by him.

It is appropriate, in the context of this work, to mention another class of structures, originally described by Skoulios and Luzzati[8], that displays interesting analogies with the rod-like class. In this class of structures the elements are lamellar: the lamellae may be in the form of infinite planar sheets packed in one-dimensional (smectic) lattice[8], infinitely long ribbons organized in two-dimensional centred-rectangular[8] or oblique[9] lattices or, finally, disks organized in three-dimensional lattices[8]. It is remarkable that all the high temperature phases of each of the anhydrous soaps studied so far belong to one or other of the two classes according to the nature of the cation: rod-like for the cations of group II, lamellar for sodium[8], potassium[9], lithium[9]. The highly developed organization of all these phases is achieved in spite of a great disorder of the paraffin chains; it is thus clear that the correlation between the chemical composition of the lipid and the class of the structures must be sought in the organization of the polar groups. Although little direct evidence is available on this question, various indirect arguments suggest that the degree of order is quite high: the fact that for different soaps of the same cation the number of molecules per unit length of rod (this work) or of ribbon[5] is constant clearly points to an ordered organization of the polar regions; the occurrence of two hexagonal phases in the magnesium and cadmium soaps is interpreted by Spegt and Skoulios[4] as a consequence of a polymorphic transition between two ordered arrangements of the polar groups. The finite length of the rods, and the finite width of the ribbons and of the disks, can best be explained by the interplay of some ordered arrangement of the polar groups and of a disordered conformation of the paraffin chains (see discussion in refs. 6 and 8).

We thank Dr A. Klug for help with the manuscript. This work was supported in part by grants from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire, and from the Direction des Recherches et Moyens d'Essais, Ministère des Armées.

Received February 12, 1968.

[1] Spegt, P. A., thesis, Univ. Strasbourg (1964).
[2] Spegt, P. A., and Skoulios, A. E., *Acta Cryst.*, **17**, 198 (1964).
[3] Spegt, P. A., and Skoulios, A. E., *Acta Cryst.*, **21**, 892 (1966).
[4] Spegt, P. A., and Skoulios, A. E., *Acta Cryst.*, **16**, 301 (1963).
[5] Luzzati, V., in *Biological Membranes* (edit. by Chapman, D.) (Academic Press, in the press).
[6] Luzzati, V., and Spegt, P. A., *Nature*, **215**, 701 (1967).
[7] Wells, A. F., *Acta Cryst.*, **7**, 535, 545, 842, 849 (1954).
[8] Skoulios, A. E., and Luzzati, V., *Acta Cryst.*, **14**, 278 (1961).
[9] Gallot, B., and Skoulios, A. E., *Acta Cryst.*, **15**, 826 (1962).
[10] *International Tables for X-ray Crystallography*, **1** (The Kynoch Press, Birmingham, 1952).

CHAPITRE II :

A - POLYMORPHISME DES LECITHINES.

Polymorphism of Lecithins

by

VITTORIO LUZZATI
T. GULIK-KRZYWICKI
A. TARDIEU

Centre de Génétique Moléculaire, CNRS,
91 Gif-sur-Yvette, France

Lecithin–water systems display a variety of phases. Several of these phases, observed at a high temperature in the presence of small amounts of water, belong to a class of structures recently discovered in the anhydrous divalent cation-soaps. In these structures the polar groups are clustered in rod-shaped regions, embedded in a disordered paraffin matrix. In one of the phases the rods are infinitely long; in two others the rods are of finite length, and join three by three, forming two and three-dimensional networks.

In a recent article[1] describing the discovery of a novel class of structures in the anhydrous soaps of the divalent cations of group II, we reported similar structures in the high-lipid high-temperature phases of lecithin–water systems. We describe here the structure of these phases. The lecithin–water systems have already been studied by several authors, and we shall discuss their work.

For most of our work we used natural lecithin extracted from hen egg yolk by the usual procedures[2], but a few experiments involved two synthetic lecithins, dipalmitoyl and dioleoyl, available in small amounts. The lecithins are highly hygroscopic, and so the samples were carefulyl handled in a dry box; the water content was determined by direct chemical analysis (Karl Fischer) after the X-ray experiments. The X-ray diffraction techniques are those used in our previous work. Some polarizing microscope observations were carried out in parallel with the X-ray experiments, using the same sample holders, and looking through an area in which the thickness of the lipid layer is small. This procedure is essential for consistent X-ray and microscope results, for otherwise it is difficult to control the hydration of the thin microscope preparations.

A portion of the phase diagram of the egg lecithin–water system is sketched in Fig. 1. Several phases are characterized by the X-ray diffraction diagrams: these are called C, $L\beta$, $L\delta$, $P\delta$, H, R, Q and $L\alpha$. Some of the phases were observed with the synthetic lecithins ($P\delta$, H and Q with dipalmitoyl; C, $L\beta$, $L\delta$, $P\delta$, R, Q and $L\alpha$ with dioleoyl); still more will probably be found after exploring the phase diagram more thoroughly. With the exception of Q, all the phases are optically birefringent.

In the high-temperature phases, H, R, Q and $L\alpha$, the conformation of the paraffin chains is highly disordered, as shown by the absence of sharp X-ray reflexions at high angles (namely at $s = 2 \sin \theta/\lambda > (7\ \text{Å})^{-1}$) and by the presence of the strong and diffuse $(4{\cdot}5\ \text{Å})^{-1}$ band, typical of

the liquid paraffins[3]. In the other phases (C, $L\beta$, $L\delta$ and $P\delta$) the organization of the chains shows some degree of periodic order, as shown by the presence of sharp high-angle reflexions. We are chiefly concerned here with the liquid–paraffin phases: only a preliminary description of the other phases will be given, for they are still being investigated.

Ordered Paraffin Phases

Phase C is three-dimensionally crystalline, with many sharp reflexions up to $s = (2\ \text{Å})^{-1}$.

Phase $L\beta$ has been observed previously with mitochondria lipids[4]; its structure is lamellar, with stiff parallel chains lying perpendicular to the plane of the lamellae and organized with rotational disorder into a two-dimensional hexagonal lattice (side about 4·2 Å).

Phase $L\delta$ is lamellar as well, shown by the spacings of the small-angle reflexions. The spacings and the intensity of the high-angle reflexions are consistent with a square two-dimensional lattice (side about 4·7 Å).

The high-angle reflexions of phase $P\delta$ can all be indexed on a two-dimensional centred rectangular lattice (Table 1); the high-angle reflexions are similar to those of phase $L\delta$, although a diffuse band near $(4{\cdot}5\ \text{Å})^{-1}$ is often quite strong. A structure can be suggested, consistent with these data: the polar groups are clustered into ribbon-like elements, organized in a two-dimensional centred rectangular lattice (compare the high-temperature phases of the anhydrous sodium soaps[5]); the paraffin chains, partly disordered and partly organized as in phase $L\delta$, fill the space between the ribbons. The observations of Chapman, Williams and Ladbrooke[6] are consistent with the existence of this phase, but these authors did not distinguish it from phase Q (see legend of Table 1).

Liquid Paraffin Phases

Phase $L\alpha$ is the well known lamellar structure formed by the sequence of lipid and water leaflets, with disordered paraffin chains. This phase, in lecithin, has been described by several authors[6–8].

Phase H is characterized by several reflexions at spacings s_1, $2\ s_1$ and $\sqrt{7}\ s_1$ (Fig. 2): these are consistent with a two-dimensional hexagonal lattice. The absence of the reflexion at $\sqrt{3}\ s_1$ and the failure to observe the extremely weak reflexion at $\sqrt{7}\ s_1$ misled Reiss-Husson[7] into thinking that the structure was lamellar. Chapman *et al.*[6] mention a high-temperature phase, characterized in their work by one X-ray reflexion, which seems to be the same as our phase H. By analogy with the H_{II} phase of brain[9] and mitochondria[4] lipids, and with the H phase of the

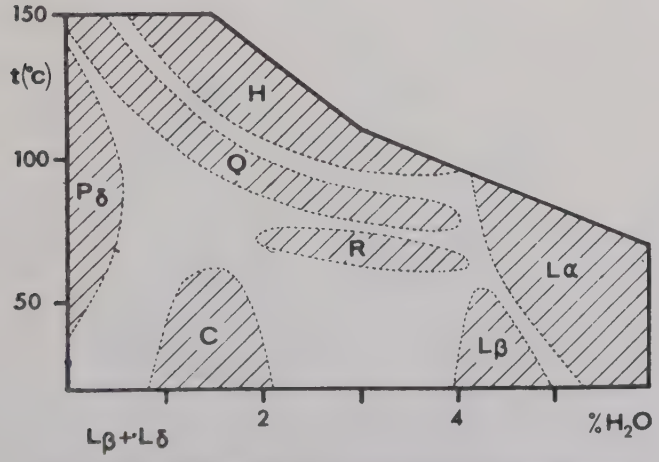


Fig. 1. The high-temperature high-lipid region of the egg lecithin-water system; study at higher temperatures is hindered by chemical degradations. The one-phase regions are hatched: the limits are not precisely known. Two or three phases are usually observed in the intermediate regions. Phase $L\delta$ was never found quite pure in this system. The higher water region is described by Reiss-Husson[7].

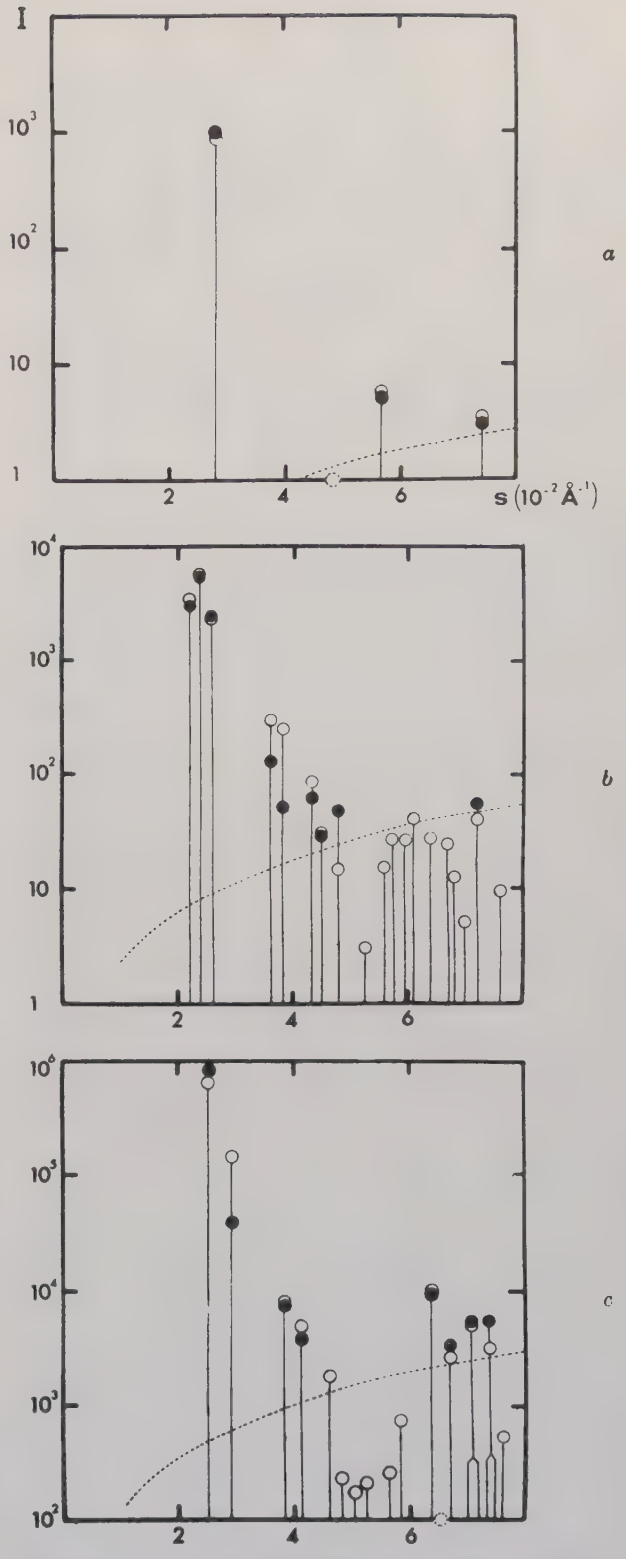


Fig. 2. Observed and calculated intensities. Egg lecithin: temperature, water concentration and lattice dimensions are given in Table 2. ●, Observed intensities. ○, Calculated intensities. ◌, Calculated intensities too small to be plotted on the scale shown. The dotted lines show the experimental limit for observation of weak intensities. Intensities are measured as described in ref. 1. *a*, Phase H, two-dimensional space group $p6$. The intensities were calculated with the formula: $I_{hk} = m^2 f^2(s) \exp(-\alpha s^2)$; m is the multiplicity factor, $f(s) = J_1(2\pi\ 12{\cdot}4\ s)/\pi\ 12{\cdot}4s$ is the form factor, $\alpha = 900$ Å^2. *b*, Phase R, space group $R\bar{3}m$. Intensities were calculated as in ref. 1, without gaps at the ends of the rods, multiplied by the same form factor as phase H. $\alpha = \beta = 400$ Å^2. *c*, Phase Q, space group $Ia3d$. Intensities were calculated as in ref. 10, without gaps at the ends of the rods, and multiplied by the same form factor as phases H and R. $\alpha = 330$ Å^2.

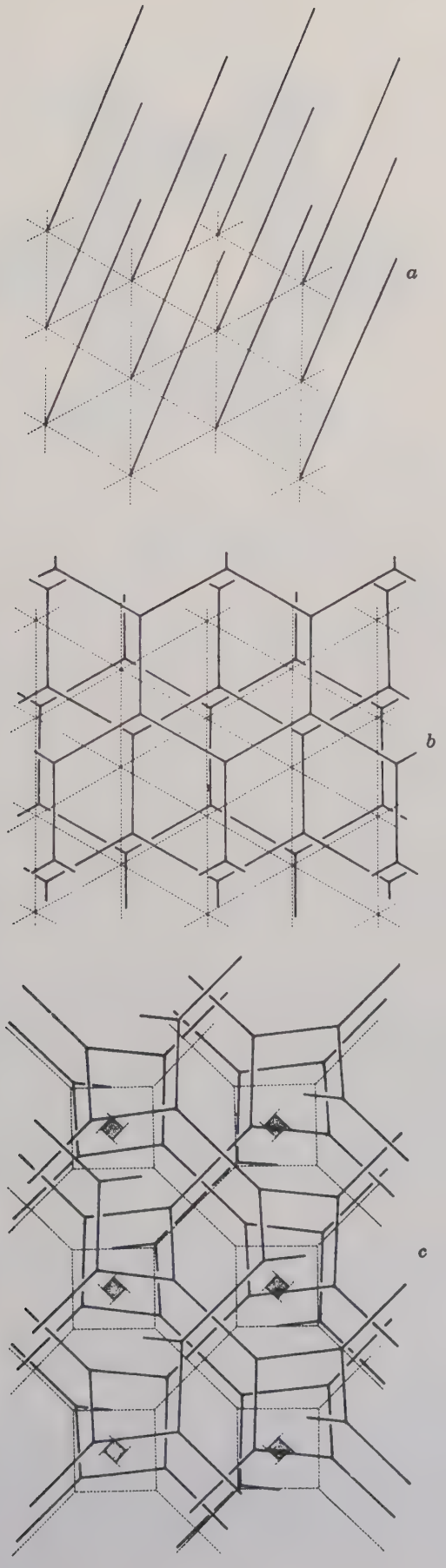


Table 1. PHASE Pδ

T (° C)	Egg lecithin 60		90		112	
h k	s_{obs} 10^{-3} Å^{-1}	s_{cal}	s_{obs}	s_{cal}	s_{obs}	s_{cal}
2 0	17·0	16·9	19·9	19·8	21·3	21·2
1 1	23·7	23·6	25·4	25·2	26·3	25·9
3 1	{33·7	33·6	37·5	37·6	39·6	39·6
4 0	{33·7	33·8	39·3	39·6	42·4	42·4
0 2	44·0	44·0	46·3	46·3	47·2	47·2
5 1	47·3	47·6				
6 0	50·7	50·7				
a (Å)	118·4		101·0		94·4	
b (Å)	45·5		43·2		42·4	

[T (° C)	Dipalmitoyl lecithin 120		130		137		145	
h k	s_{obs} 10^{-3} Å^{-1}	s_{cal}	s_{obs}	s_{cal}	s_{obs}	s_{cal}	s_{obs}	s_{cal}
2 0	17·0	17·0	17·5	17·5	18·5	18·3	19·2	19·0
1 1	24·1	24·0	24·5	24·3	24·8	24·8	25·2	25·0
3 1	{34·1	34·0	34·4	34·6	35·5	35·8	36·6	36·7
4 0	{34·1	34·0	35·0	35·0	36·6	36·6	38·1	38·1
0 2	45·0	45·0	45·3	45·3	46·0	46·0	46·3	46·3
6 0			52·6	52·5			57·1	57·1
a (Å)	117·6		114·4		109·2		105·0	
b (Å)	44·4		44·1		43·5		43·2	

The symbols s_{obs} and s_{cal} ($s = 2 \sin\theta/\lambda$) refer to the observed reflexions and to the reciprocal lattice points of the two-dimensional centred rectangular cell of parameters a and b. The amount of water of the egg lecithin sample was less than 0·2 per cent; the dipalmitoyl sample was dry, but the water content was not determined by direct chemical analysis. This phase is reported by Chapman *et al.*[6] with the interpretation that the lattice is body-centred cubic. In fact only at one particular temperature, at which the spacings of the reflexions (31) and (40) coincide, does the ratio of the spacings become consistent with a body-centred cubic lattice ($1 : \sqrt{2} : \sqrt{4} : \sqrt{7}$). Furthermore, this phase is optically birefringent, although minute amounts of water transform it into the isotropic phase Q.

divalent cation soaps[1], the structure seems to be formed by long rigid parallel rods organized in a two-dimensional hexagonal lattice; the interior of the rods is occupied by the polar groups, the paraffin chains fill the gap between the rods (Fig. 3*a*). The absence of the reflexion at $\sqrt{3}\ s_1$, and more generally the whole distribution of the observed intensities, can be explained by the form factor of the rods. Indeed, the polar regions in lecithins are fairly bulky and the shape must be taken into account. The volume of these regions can be estimated as discussed in ref. 4; then, on the assumption that the rods are circular cylinders, the radius can be determined: the value found is 11·6 Å (Table 2). Because the form factor of a uniform cylinder of radius r_1 is $J_1(2\pi r_1 s)/\pi r_1 s$, the value of r_1 can also be determined on the assumption that the first zero, at $2\pi r_1 s = 3{\cdot}8$, coincides with the position of the absent reflexion, at $s = \sqrt{3}\ s_1 = 0{\cdot}0489$ Å^{-1}: $r_1 = 12{\cdot}4$ Å. Because neither the densities of the polar and paraffin regions nor the electron density distribution are known with great accuracy, the agreement of the two radii can be considered satisfactory. The observed intensities and the intensities calculated with the form factor of a uniform cylinder of radius 12·4 Å are compared in Fig. 2.

Phase Q is cubic, as noted by Reiss-Husson[7], but body-centred rather than face-centred as she assumed: this is shown by the presence of a weak reflexion at $\sqrt{7/3}\ s_1$, following two strong reflexions at s_1 and at $\sqrt{4/3}\ s_1$ (see previous comments on the cubic phase in the work of Chapman *et al.*[6]). The structure seems to be similar to that of the body-centred cubic phase of the divalent cation soaps[10], that is, identical rod-like elements of finite length, linked three by three into two distinct three-dimensional networks, which are unconnected but mutually interwoven (Fig. 3*c*). The agreement of the observed and calculated intensities is excellent for this structure, if the distribution of the polar groups is uniform along the rods, without gaps at the ends (see ref. 10), and the structure factors are modulated by the form

Fig. 3. Perspective view of the structure of the phases H, R and Q. The loci of the polar groups are rods: the heavy lines represent the position of the centre of the rods. The dotted lines show the limits of the cells in projection. *a*, Phase H is a two-dimensional hexagonal array of indefinitely long parallel rods (space group $p6$). *b*, Phase R (ref. 1). The rods, linked three by three, form planar two-dimensional hexagonal networks. The networks are stacked regularly in a three-dimensional lattice (space group $R\bar{3}m$). *c*, Phase Q (ref. 10). The rods, linked three by three, form two interwoven three-dimensional networks (space group $Ia3d$). The terminology of the phases originated from: H, hexagonal; R, rhombohedral; Q, cubic.

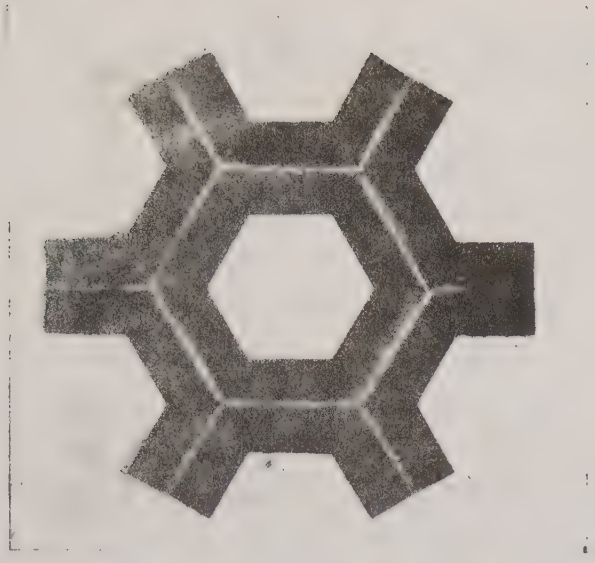


Fig. 4. Phase R: a (tentative) realistic representation of one of the two-dimensional hexagonal networks, with the dimensions of the polar rods shown to scale (Table 2).

factor of a uniform cylinder with the same radius as that found for phase H (see legend of Fig. 2). A conspicuous property of this phase, which is common to all the cubic phases observed in lipid–water systems[6,7,10,11], is the frequent growth of fairly large crystals; furthermore, this phase is optically isotropic.

Phase R does not seem to have been observed so far in lecithin. Its reflexions can be indexed on a rhombohedral lattice (Fig. 2*b*); the structure most likely resembles that of the R phase of soaps[1], and is formed by identical rod-like elements, linked three by three into two-dimensional planar hexagonal networks, that are stacked in a three-dimensional rhombohedral lattice (Fig. 3*b*). The observed and calculated intensities are compared in Fig. 2*b*; the agreement is again quite satisfactory if the distribution along the rods is uniform, without gaps, and if the same form factor is adopted as in phases H and Q (see legend of Fig. 2).

In phases Q and R the shape of the polar regions is rather awkward for calculation, as the length of the rods barely exceeds their diameter (Table 2; Fig. 4). As a consequence, the model used for the calculation of the intensities can only be taken as a rough approximation. To compare the dimensions of the rods in the different phases, the shape of the intersections must be taken into account. When this is done, both the radius of the rods and the average area available to one lipid molecule on the rod surface are in close agreement for the three phases (Table 2), thus providing an independent confirmation of the structures.

Role of this Polymorphism

As we have noted recently[1], many of the phases observed in lipids can be assorted in two classes: lamellar and rod-like. In the structures of the first class the basic structural element is the lamella; the lamellae may be infinite planar sheets, infinitely long ribbons or disks of finite size. In the structures of the second class the basic structural elements are identical rods, either infinitely long or of finite length. We have shown that all the high temperature phases of each of the anhydrous soaps studied so far belong to one or other of the two classes, according to the nature of the cation: lamellar for lithium, sodium and potassium, rod-like for the divalent cations of group II. The phases of lecithin can be similarly sorted into these two classes.

The phases $L\alpha$, $L\beta$, $L\delta$ and $P'\delta$ belong to the lamellar class. The lamellae are infinite planar sheets in $L\alpha$, $L\beta$ and $L\delta$ and ribbons in $P'\delta$; the conformation of the paraffin chains is liquid-like in $L\alpha$, and partly ordered in the other phases.

The phases H, Q and R, which belong to the rod-like class, are located in the high-temperature high-lipid region of the phase diagram (Fig. 1). The rods, which are by definition the loci of the polar groups, have similar cross-dimensions in the three phases (Table 2). In phase H the rods are infinitely long (one-dimensional network) and are organized in a two-dimensional hexagonal lattice (Fig. 3*a*). In phases R and Q the rods, which are all identical and of finite length, are linked three by three; in phase R the rods form many regularly stacked two-dimensional hexagonal networks; in phase Q the rods define two interwoven three-dimensional notworks (Fig. 3).

We have discussed before the role of the polymorphism of lipids in the structure and function of biological membranes. One obvious limitation to our speculations was the fact that the structure of all the lipid phases known at that time was essentially three-dimensional, with the exception of the lamellar phase. The discovery of phase R removes this limitation, for its structure is intrinsically two-dimensional, and yet it is not formed by uniform lipid leaflets. A fabric-like membrane structure could well be imagined, with "threads" formed by lipid rods organized in a two-dimensional network. The protein molecules could be fitted into the two-dimensional lattice, either sitting on both faces, or accommodated in the plane of the framework, between the rods. The objection that the rod-like phases described here exist only in almost dry preparations is perhaps not too serious, because models of opposite polarity, with the paraffin chains inside the threads of the fabric, could well exist in more highly hydrated preparations; for example, the widespread "middle" phase of soap–water systems is formed by paraffin filled lipid rods embedded in water[3,9]. It may be noted that this fabric-like model reconciles one aspect of the Danielli–Davson model, namely the existence of a continuous lipid matrix, with the sort of ordered two-dimensional structure required by models of the mosaic type.

Table 2. SOME DIMENSIONS OF PHASES R, Q AND H

	T (° C)	Water conc. (%)	δ (g cm^{-3})	a (Å)	c (Å)	N Molec.	L (Å)	R_{pol} (Å)	σ/v (Å^{-1})	S Å^2
R	75	3	0·98$_5$	55·4	123	79·4	32·$_0$	11·5	0·15$_4$	64·$_0$
Q	82	3	0·97$_4$	96·2		647	34·$_0$	11·1	0·16$_3$	67·$_0$
H	120	1·5	0·95$_0$	41·0		1·04	∞	11·6	0·17$_3$	69·$_4$

The structure of the phases is shown in Fig. 3. The density is calculated with the formula: $\delta T = \delta_{25°}$ [1−7·48 × 10^{-4} (T-25°)] (refs. 1 and 7). The symbols a and c represent the lattice parameters. The molecular weight adopted for egg lecithin is 786 (ref. 7). N is the number of molecules, per unit cell in phases R and Q, per hexagonal cell of length $c = 1$ Å in phase H (refs. 1, 3 and 9). L is the length of one rod. The determination of the polar and the paraffin volumes is discussed in ref. 4: $v_{pol} = 359$ Å^3/molecule, $v_{par} = 922$ Å^3/molecule, at 25° C. The radius of the polar rods R_{pol}, and the surface per volume of the rods σ/v, are calculated taking into account the shape at the junctions (Fig. 4). S is the average area per paraffin chain at the surface of the polar rods.

We thank Dr F. Reiss-Husson for her interest, Professor L. L. M. van Deenen for synthetic lecithins and Dr A. Klug for help with the manuscript. This work was supported in part by grants from the Délégation Générale pour la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire, and from the Direction des Recherches et Moyens d'Essais du Ministère des Armées.

Received April 5, 1968.

[1] Luzzati, V., Tardieu, A., and Gulik-Krzywicki, T., *Nature*, **217**, 1028 (1968).
[2] Singleton, W. S., Gray, M. S., Brown, M. L., and White, J. L., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 53 (1965).
[3] Luzzati, V., in *Biological Membranes* (edit. by Chapman, D.) (Academic Press, in the press).
[4] Gulik-Krzywicki, T., Rivas, E., and Luzzati, V., *J. Mol. Biol.*, **27**, 303 (1967).
[5] Skoulios, A. E., and Luzzati, V., *Acta Cryst.*, **14**, 278 (1961).
[6] Chapman, D., Williams, R. M., and Ladbrooke, B. D., *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 445 (1967).
[7] Reiss-Husson, F., *J. Mol. Biol.*, **25**, 363 (1967).
[8] Small, D. M., and Bourgès, M., *Mol. Crystals*, **1**, 541 (1966).
[9] Luzzati, V., and Husson, F., *J. Cell Biol.*, **12**, 207 (1962).
[10] Luzzati, V., and Spegt, P. A., *Nature*, **215**, 701 (1967).
[11] Luzzati, V., and Reiss-Husson, F., *Nature*, **210**, 1351 (1966).

B - ADDITIF A L'ARTICLE "POLYMORPHISME DES LECITHINES".

Dans cet article, ont été décrites, les phases H, Q, R, observées dans les lécithines. Afin que la description des phases à chaînes liquides soit complète, il faudrait maintenant décrire la phase lamellaire Lα. Comme la phase Lα observée avec la lécithine d'oeuf a déjà été décrite par plusieurs auteurs (Reiss-Husson (1967), Small et Bourges (1966), Chapman et al (1967), Levine (1970)) nous nous contenterons de rappeler ici ses caractéristiques principales.

La structure est formée par un empilement de feuillets lipidiques identiques et équidistants, séparés par des couches d'eau. Les chaînes paraffiniques "liquides" remplissent l'intérieur des feuillets lipidiques, les groupes polaires couvrent la surface. Cette phase incorpore jusqu'à 45% d'eau environ, l'eau en excès forme une phase séparée, en équilibre avec la phase lamellaire contenant 45% d'eau. L'épaisseur du feuillet lipidique décroit lorsque la concentration en eau augmente, et atteint une valeur limite pour une concentration en eau de l'ordre de 30%.

Quelques résultats obtenus avec les lécithines synthétiques méritent d'être rapportés ici : toutes les lécithines étudiées ont le même comportement que la lécithine d'oeuf, sauf la lécithine possédant les chaînes paraffiniques les plus courtes (C8), qui présente une véritable transition de phase vers 45% d'eau. Dans ce dernier cas, la phase Lα donne lieu à une phase micellaire pour des concentrations en eau supérieures à 45%. Il est à l'heure actuelle difficile de dire si dans cette phase, les lipides forment de véritables "micelles" ou des lamelles désorganisées.

En table II sont données les valeurs de l'épaisseur du feuillet lipidique observées pour ces diverses lécithines au taux maximum d'hydratation.

Rappelons enfin que l'addition d'environ 6% de lipides portant des charges nettes, à la lécithine, permet de faire "gonfler indéfiniment" la phase Lα. Ce phénomène a fait au laboratoire l'objet d'une étude particulière, (Gulik-Krzywicki, Tardieu et Luzzati, 1969) dont nous utiliserons les conclusions par la suite.

TABLE II - EPAISSEUR DU FEUILLET LIPIDIQUE DANS LA PHASE Lα AU TAUX D'HYDRATATION MAXIMUM.

Composé	Température	Epaisseur du feuillet lipidique
Lec di C8	22°C	24 Å
di C10	22°C	30 Å
di C12	22°C	34 Å
C10C18	22°C	37 Å
di C14	30°C	37 Å
di C16	50°C	41 Å

CHAPITRE III :

A - STRUCTURE DES PHASES CUBIQUES DES SYSTEMES LIPIDES-EAU.

Structure of the Cubic Phases of Lipid–Water Systems

AMONG the numerous phases reported in lipid–water systems a few display a cubic symmetry; the structure of these phases has been the subject of several controversial reports. We show in this article that all these cubic phases are similar: the lattice is body-centred, and the structure consists of networks of rods (Fig. 1); in some cases the rods are filled by the paraffin chains, in others by the polar moieties.

The first of these cubic phases was observed by Luzzati *et al.*[1,2]. This phase was characterized as follows[1]: (*a*) it is optically isotropic; (*b*) its X-ray diffraction diagrams contain the 4·5 Å diffuse band typical of the "liquid" paraffins and (*c*) two sharp and strong small angle reflexions, the spacings ratio of which is $\sqrt{3} : \sqrt{4}$. Because this is the ratio of the first two reflexions of the face-centred cubic lattice the choice of this type of lattice seemed a matter of course; further, the occasional observation[1] of two weak reflexions at spacings ratios $\sqrt{8}$ and $\sqrt{11}$ appeared to confirm the choice. The first structure proposed consisted of close-packed spheres filled by the paraffin chains and embedded in a paraffin matrix[1]; some cogent criticism raised by Clunie *et al.*[3] later led Luzzati and Reiss-Husson[4] to revise the model in favour of water-filled spheres embedded in a paraffin matrix. In the meantime another cubic phase was reported by Spegt and Skoulios[5] in the anhydrous strontium soaps, with a body-centred lattice. The structure of this phase was solved recently by Luzzati and Spegt[6]; the polar groups are clustered in rod-like elements of finite length, linked into three-dimensional networks (Fig. 1). Still another cubic phase was later reported in lecithin with optical and crystallographic properties identical to those of the cubic phase of soap–water systems. The structure of this phase was at first considered to consist of spheres, close-packed in a face-centred cubic lattice[7]; a recent analysis has shown that the lattice is in fact body-centred, and that the structure is most likely similar to that of the strontium soaps[8]. It is clear that these recent results cast a doubt on the very existence of a "face-centred" cubic phase: thus we took the decision to reinvestigate the problem.

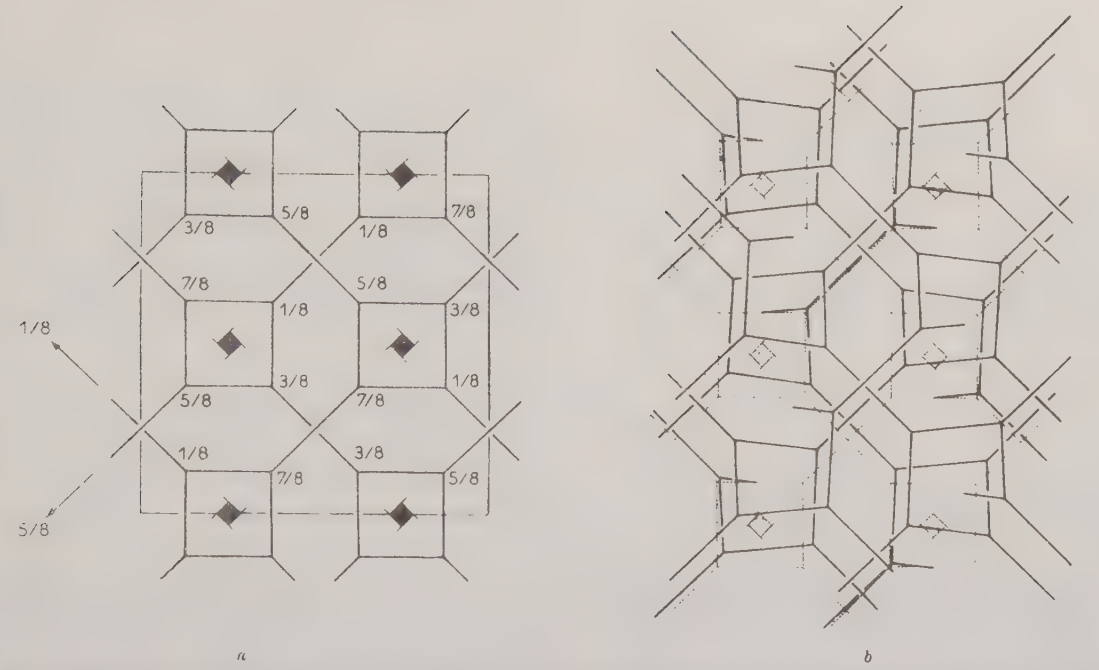


Fig. 1. Schematic representation of the structure. The lattice is cubic body-centred, space group I*a*3*d*. The structure is formed of rods of finite length, all identical and crystallographically equivalent, that join three by three and form two three-dimensional networks, mutually interwoven and unconnected. The axes of the rods, that sit on crystallographic two-fold axes, are represented by heavy lines. *a*, Projection on the plane *a b* with the position of some of the structure elements. The thin lines show the limits of one unit cell; the fractional figures are the *z* coordinates of the intersections of three rods. *b*, Perspective view. The dotted lines are the projections of the heavy lines on the plane *a b*. Note that the closest contact occurs along the three-fold axis (1/8, 1/8, 1/8 to 3/8, 3/8, 3/8).

As it has often been noted, the analysis of the Debye–Scherrer diagrams of the cubic phase is generally hindered by a heavily spotted appearance, a consequence of the easy growth of fairly large crystals. In the study of the cubic phase of lecithin[8] the crystals were successfully broken up by running the samples through a number of annealing-quenching cycles. The same procedure gives excellent results with the cubic phases of soaps and detergents: the homogeneity of the X-ray diagrams greatly improves and the number of visible reflexions increases. The new crystallographic data are shown in Table 1. The presence of the reflexions at spacing ratios $\sqrt{7}$ and $\sqrt{10}$ (indices (321) and (420)) rules out the face-centred cubic lattice previously adopted. These reflexions are very close to those at spacings ratios $\sqrt{8}$ and $\sqrt{11}$ (indices (400) and (332)): it now appears that in our previous X-ray diagrams the reflexions (321) and (420) were blurred into the spotty streaks of (400) and (332) (the streaks are a consequence of the line collimation used in our Guinier type cameras).

The fact that the reflexions of same indices are observed with all the lipids (see Table 1) indicates that the space group is most likely the same in all the cases. The choice of the space group I*a*3*d* is quite unambiguous in this case, for the number of systematic absences is quite high ((110), (200), (310), and so on) (see discussion in ref. 6).

Table 1. X-RAY DIFFRACTION DATA

	SrC_{16}		Lec		Gal		KC_{12}		$C_{16}TAB$	
hkl	I_{cal}	I_{obs}	I_{cal}	I_{obs}	I_{cal}	I_{obs}	I_{cal}	I_{obs}	I_{cal}	I_{obs}
211	10,000	12,350	10,000	12,000	10,000	1,800	10,000	7,320	10,000	6,000
220	975	1,020	520	2,080	520	520	980	980	1,280	1,280
321	43	48	115	104	21	35	6	12	13	14
400	333	145	67	52	17	31	7	16	6	10
420	1,950	794	26	< 20	24	40	27	31	31	30
332	2,040	1,205	3	< 20	70	56	117	85	120	59
422	470	333	2	< 20	22	7	70	25	51	11
431	110	208	3	< 20	9	< 7	30	14	13	< 11
521	5	< 10	3	< 20	2	< 7	25	< 14	11	< 11
440	5	< 10	10	< 20	9	< 10				
611 } 532 }	376	259	143	133	127	24				
620	1	< 10	1	< 25	0	< 12				
541	152	132	38	48	34	20				
631	173	118	21 }	78	28	20				
444	91	60	49 }		21 }	30				
543	155	187	42	81	22 }					
640	3	< 15	1	< 30	1	< 20				
a (Å)	63·0		96·2		110·2		78·6		98·0	
t (° C)	235		82		64		80		60	
c	1		0·97		0·88		0·64		0·80	
r_1 (Å)	0		12·4		15·4		12·8		17·1	
r_2 (Å)	0		12·4		15·4		14·0		20·1	
K	0		0		0		0·72		0·93	
s (Å)	1·5		0		1·4		3·4		4·9	
a (Å³)	175		330		460		290		1000	

The chemical notation is given in Tables 2 and 3. *a* : Parameter of the cubic cell; *c* : weight concentration (lipid/lipid + water). In each system the spacings of all the observed reflexions are in perfect agreement with the reflexions of a cubic lattice with the indices given in the table: $s_{obs} = a^{-1}(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$. The intensities were measured as discussed in ref. 13. I_{cal} takes the form: $I_{hkl} = m\ F^2_{hkl} f^2(s) \exp(-a\ s^2)$. *m* is the multiplicity factor; F_{hkl} is the structure factor of the framework with a gap of length *s* at each end[4]; $f(s) = J_1(2\pi r_1 s)/\pi r_1 s - K J_1(2\pi r_2 s)/\pi r_2 s$ with $K = r_2^2(\varrho_2 - \varrho_0)/r_1^2(\varrho_1 \varrho_1)$, is the form factor of a uniform circular cylinder of radius r_1 and density ϱ_1 surrounded by a cylindrical shell of external radius r_2 and density ϱ_2 where ϱ_0 is the density of water. The intensities are further multiplied by a normalizing factor, such that $I_{211} = 10{\cdot}000$.

The analogy of the intensity distribution (see Table 1) further suggests that in all the cases the structure is similar. For this class of structure, in which a topological distinction can be made between the "inside" and the "outside", it is proper to distinguish two types of distributions : type I if the paraffin chains are inside the rods and the water outside, type II if the opposite occurs[2,9]. The cubic phases of the strontium soaps and of lecithin have been shown to belong to type II; several arguments will now be given in favour of a rod-like structure of type I for the cubic phase of the soaps and detergents of Table 2.

Table 2. SOME DIMENSIONS OF THE BODY-CENTRED CUBIC STRUCTURE, TYPE I (PARAFFIN CHAINS INSIDE THE RODS)

	KC_{12} ref. 15	KC_{14} ref. 15	KC_{16} ref. 15	$C_{12}TAB$*	$C_{16}TAB$ ref. 15	$TAC_{12}I$ ref. 3
a (Å)	78·6	90·7	99·5	76·9	98·7	82·9
t (°C)	100	100	100	70	70	20
$\bar{v}$ (cm^3g^{-1})	0·99	1·01	1·03	0·99,	1·02,	1·08
Φ	0·64	0·62	0·62	0·82	0·80	0·70
l (Å)	27·8	32·1	35·2	27·2	34·9	29·3
r (Å)	14·0	15·9	17·5	15·9	20·2	15·7
S (Å²)	46·8	47·5	48·8	51·0	49·6	47·5

* Unpublished observations of F. Reiss-Husson.

KC_n : $CH_3.(CH_2)_{n-2}.COO^-K^+$; C_nTAB : $CH_3.(CH_2)_{n-2}.CN^+(CH_3)_2.Br^-$; $TAC_{12}I$: $CH_3.(CH_2)_{10}.CON^-.N^+(CH_3)_3$. a : parameter of the cubic cell; $\bar{v}$: specific volume of the lipid; Φ : volume concentration; r and l : radius and length of the rods ($l = a/\sqrt{8}$); S: area per polar group on the lipid-water interface (the surface of the rods). r and S are determined using the expressions for the volume $v = \pi r^2 l\,(1-0{\cdot}491\ r/l)$ and for the external surface $\sigma = 2\ \pi r l\ (1-0{\cdot}735\ r/l)$ of one rod, doubly bevel-edged at each end to meet with two other rods (see Fig. 4 of ref 8) and taking into account the relationships $\Phi = 24\ v/a^3$ and $S = (a/v)\ (M\bar{v}/0{\cdot}602)$. M is the molecular weight of the lipid.

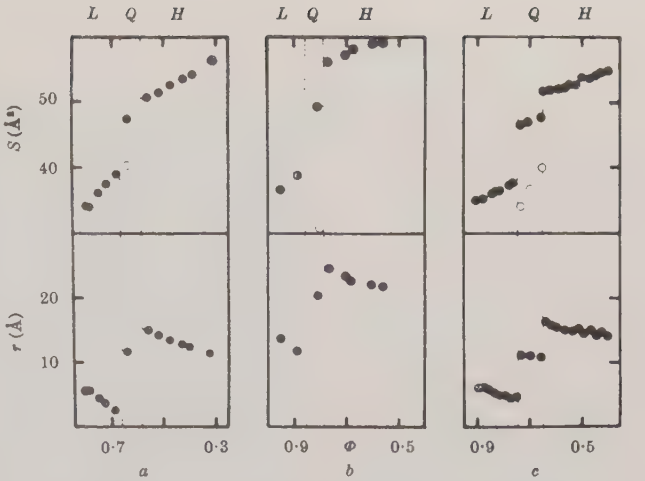


Fig. 2. Dimensions of the structure elements of the lamellar (L), cubic (Φ) and hexagonal (H) phases of some lipid–water systems. Φ, Volume concentration; r, radius of the rods in the cubic and hexagonal phases, half-thickness of the lipid leaflet in the lamellar phase. In the cubic phase the value of S for the structure of type I (paraffin-filled rods) is shown by full dots, for type II by open circles. Note that S increases throughout the phase diagram, as a function of decreasing Φ, only if the cubic phase is of type I. The notation for the lipids is that of Table 2. a, KC_{14} (replotted from ref. 14); very similar results are obtained with the other potassium soaps. b, $C_{16}TAB$ (replotted from ref. 15, with $\bar{v} = 1{\cdot}027$); similar results for $C_{12}TAB$. c, $TAC_{12}I$ (replotted from ref. 3).

The first argument is provided by the order of succession of the phases as a function of increasing water concentration, a criterion introduced by Luzzati and Husson[2,9]. In some systems, the hexagonal phase of which is known to be of type I (refs. 2 and 9), the order is lamellar–cubic–hexagonal; the soaps and detergents of Table 2 belong to this family. In other systems the order is reversed; in one of these, lecithin–water, both the cubic and the hexagonal phases are of type II (ref. 8) (the same is true for galactolipids, see Table 3). As a rule it can thus be presumed that the structure of the cubic and hexagonal phases is of type I if the order of succession of the phases, as a function of increasing water concentration, is lamellar–cubic–hexagonal, of type II if the order is reversed (see also ref. 10).

A second argument, often used in the discussion of lipid–water systems[2,9], is based on the proposition that the average area per polar group on the paraffin–water interface increases regularly as the water content increases, even when phase boundaries are crossed. The values of S of the cubic phases, for both types of structures, are plotted in Fig. 2, and are compared with those of the lamellar and hexagonal phases. In two of the cases ($C_{16}TAB$ and $TAC_{12}I$) the area-concentration relationship is satisfactory only if the cubic structure is of type I; in the potassium soaps the relationship is acceptable for both types of structure. The result of a similar comparison in lecithin and galactolipids is shown and discussed in Table 3.

Table 3. SOME DIMENSIONS OF THE CUBIC AND HEXAGONAL PHASES OF TYPE II (POLAR GROUPS INSIDE THE RODS)

	SrC_{14} (ref. 6)		Lec (ref. 8)		Gal*	
	Q	H	Q	H	Q	H
a (Å)	62·6	24·9	96·2	41·0	110·2	46·7
t (°C)	235	265	82	120	64	64
$\bar{v}$ (cm/g)	1·165	1·193	1·025	1·052	0·986	0·986
c	1	1	0·97	0·98	0·88	0·96
l (Å)	22·2	∞	34·0	∞	39·0	∞
r (Å)			11·1	11·6	15·6	15·0
S			67·0	69·6	73·3	69·4
N	0·51$_6$	0·49$_6$				

* Unpublished observations of E. Rivas.

$SrC_{14} = [CH_3.(CH_2)_{12}.COO^-]_2\ Sr^{++}$; Lec; hen egg lecithin; Gal : maize chloroplasts galactolipids. Q : body-centred cubic phase; H : hexagonal phase. Notation and calculations as in Table 2; N: number of lipid molecules per length of rod. The rods are supposed to contain the polar groups of the lipid molecules and the small amount of water of the system. Note that N (and S) take similar values in the cubic and the hexagonal phases; a more systematic comparison of the dimensions of the hexagonal, cubic and lamellar phases is hindered here by the differences of temperature and concentration (see ref. 9).

The last argument is the agreement of the observed and calculated intensities. In the case of the strontium soaps the agreement is excellent for a uniform distribution of scattering matter along very thin rods with a short (1·5 Å) empty gap at each end[6]. In the other cases the rods are bulkier and the electron density distribution away from the rod axis cannot be neglected. The form factor adopted for lecithin is that of an infinite uniform cylinder[8]; for soaps and detergents the experience acquired with the micellar[11], hexagonal[7] and lamellar[12] phases suggests a model formed of a uniform paraffin cylinder, surrounded by a cylindrical shell containing the polar groups of the lipid molecules. The radii of the two cylinders and the electron density of the paraffin region are easily determined; the electron density of the polar region is somewhat arbitrary because the precise space distribution of the counterions is not known. Besides, the length of the empty gap at each end of the rods is adjusted to improve the agreement of the calculated and observed intensities (note in Table 1, that ε is smaller than the radius of the rod). The final dimensions are given and the intensities are compared in Table 1. The agreement is quite satisfactory; it must be noted, nevertheless, that the crystallographic verifications, quite straightforward in the case of the strontium soaps[6], are less conclusive for the other systems, for the model used for calculation can only be taken as a rough approximation. Indeed (see Fig. 4 of ref. 8), the length of the rods barely exceeds their diameter.

We thus reach the conclusion that the most satisfactory structure for all the cubic phases reported so far in lipid–water systems is formed of rod-like elements, all identical and crystallographically equivalent, linked three by three into two three-dimensional networks, mutually interwoven and unconnected (Fig. 1). In some cases the rods are filled by the paraffin chains, in others by the polar moieties.

This structure is remarkably compact. The maximum volume fraction occupied by the rods, corresponding to rods in contact along the three-fold axis (see Fig. 1), is 0·874; this figure should be compared with 0·907 for close-packed circular rods and with 0·741 for close-packed spheres. Another interesting property, unique so far

among the lipid–water phases, is the presence of two media, one paraffinic and one polar, both continuous throughout the three-dimensional structure. The high viscosity and the easy growth of large crystals are most likely related to this peculiar distribution of the two media. Besides, a structure formed of rods and displaying a water continuum is consistent with the observation reported by Gilchrist *et al.*[10] that the electrical conductivities of the cubic and the hexagonal phases are closely related.

The regular area-concentration relationship observed through phases displaying such a variety of structures confirms the outstanding contribution of the interface to the stability of the structures (see discussion in ref. 9). It also appears that in the cubic phase another important factor is compactness. We have elsewhere[6,13] explained the fragmentation of the rods into segments of finite length in terms of the disordered conformation of the paraffin chains and of a somewhat ordered arrangement of the polar groups. A similar explanation can be given for the cubic phase of type I. Indeed, as the water concentration decreases the area S shrinks[14] and the paraffin chains stiffen. If the rods are indefinitely long (as in the hexagonal phase), and if the chains are sufficiently stiff, the centre of the rods becomes overcrowded: the result of breaking up the rods is to offer additional room for the expansion of the chains.

We thank Dr A. Klug for help with the manuscript. This work was supported in part by the Délégation Générale pour la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire.

Vittorio Luzzati
A. Tardieu
T. Gulik-Krzywicki
E. Rivas
F. Reiss-Husson

Centre de Génétique Moléculaire,
CNRS,
Gif-sur-Yvette, France.

Received July 26, 1968.

[1] Luzzati, V., Mustacchi, H., Skoulios, A. E., and Husson, F., *Acta Cryst.*, **13**, 660 (1960).
[2] Luzzati, V., and Husson, F., *J. Cell Biol.*, **12**, 207 (1962).
[3] Clunie, J. S., Corkill, J. M., and Goodman, J. F., *Proc. Roy. Soc.*, A, **285**, 520 (1965).
[4] Luzzati, V., and Reiss-Husson, F., *Nature*, **210**, 1351 (1966).
[5] Spegt, P. A., and Skoulios, A. E., *Acta Cryst.*, **21**, 892 (1966).
[6] Luzzati, V., and Spegt, P. A., *Nature*, **215**, 701 (1967).
[7] Reiss-Husson, F., *J. Mol. Biol.*, **25**, 363 (1967).
[8] Luzzati, V., Gulik-Krzywicki, T., and Tardieu, A., *Nature*, **218**, 1031 (1968).
[9] Luzzati, V., in *Biological Membranes* (edit. by Chapman, D.) (Academic Press, New York, 1968).
[10] Gilchrist, C. A., Rogers, J., Steel, G., Vaal, E. G., and Winsor, P. A., *J. Coll. Interf. Sci.*, **25**, 409 (1967).
[11] Reiss-Husson, F., and Luzzati, V., *J. Coll. Interf. Sci.*, **21**, 534 (1966).
[12] Gulik-Krzywicki, T., Rivas, E., and Luzzati, V., *J. Mol. Biol.*, **27**, 303 (1967).
[13] Luzzati, V., Tardieu, A., and Gulik-Krzywicki, T., *Nature*, **217**, 1028 (1968).
[14] Gallot, B., and Skoulios, A. E., *Koll. Z.*, **208**, 37 (1966).
[15] Husson, F., Mustacchi, H., and Luzzati, V., *Acta Cryst.*, **13**, 668 (1960).

B - POLYMORPHISME DES LIPIDES : UNE PHASE CUBIQUE NOUVELLE. UNE STRUCTURE A CAGE DE TIGES ENFERMANT DES MICELLES SPHERIQUES.

POLYMORPHISM OF LIPIDS
A NOVEL CUBIC PHASE—A CAGE-LIKE NETWORK OF RODS WITH ENCLOSED SPHERICAL MICELLES

A. TARDIEU AND VITTORIO LUZZATI
Centre de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette (France)
(Received May 15th, 1970)

SUMMARY

Among the numerous lipid–water phases a few crystallize in the cubic system and offer interesting crystallographic problems. One of these (space group Ia3d) consists of rods of finite length, joined three by three and forming two three-dimensional networks, mutually interwoven and unconnected. We describe the structure of another widespread cubic phase, space group Pm3n. The structure consists of a three-dimensional network of rods of finite length, all crystallographically equivalent, which meet three by three at one end and four by four at the other and form the bars of a system of cages, each of which encloses a spherical micelle (chlathrate-type structure). The "liquid" hydrocarbons occupy the interior of the rods and spheres, the water fills the interstices. The hydrocarbon–water interface is covered by the polar groups of the lipid molecules.

INTRODUCTION

Until a few years ago the crystallography of lipid–water systems was presented as a shallow subject, involving only lamellar structures. A systematic study undertaken by our group some 15 years ago, did in fact uncover quite a complex polymorphism with a large number of phases displaying a surprising variety of structures (see review in ref. 1). These structures may be sorted in two main classes: (a) lamellar, containing planar elements, which may be indefinite sheets packed in a one-dimensional lattice, ribbons indefinitely long and of finite width packed in two-dimensional lattices or discs of finite dimensions packed in three-dimensional lattices; (b) rod-like, containing either indefinitely long and stiff rods packed in a two-dimensional hexagonal lattice, or identical rods of finite length joined three by three or four by four and organized in a variety of three-dimensional lattices (see DISCUSSION below). In most of the phases the short-range organization of the hydrocarbon and of the water regions is of the liquid type. Besides, two types of structures are observed whenever a topological distinction can be made between the internal and the external volumes of the structure elements, those with the hydrocarbons "inside" and the water "outside" (Type I), and *vice versa* (Type II).

From the crystallographic standpoint one family of phases, crystallizing in the

cubic systems, is particularly interesting. One of these, commonly observed in a variety of lipid–water systems in the concentration range intermediate between the lamellar and the hexagonal phases, has been the object of several recent reports[1–4]. The space group is Ia3d; the structure consists of rod-like elements of finite length, linked three by three into two three-dimensional networks, mutually interwoven and unconnected (see Fig. 1 in ref. 4). In some systems the interior of the rods is filled by the hydrocarbon chains, in others by the polar groups[4].

We have reported recently[5] the observation of several other cubic phases. We discuss here the determination of the structure of one of these. This phase was found originally in three-component systems involving sodium caprylate, organic solvents and water[6]. It has since been observed in several two-component lipid–water systems: dodecyl trimethylammonium chloride[7], egg lysolecithin (A. TARDIEU, unpublished), lauryl decaethylene glycol ether (A. TARDIEU AND K. FONTELL, unpublished) and in a variety of three-component systems containing sodium or potassium soaps, water and organic solvents (heptane, decane, *p*-xylene). This phase, like all the cubic phases, is optically isotropic and highly viscous. It easily yields fairly large crystals (to the extent that a rotating sample holder had to be used in order to record satisfactory X-ray powder diagrams), and its X-ray diffraction diagrams contain the 4.5 Å band typical of the "liquid" paraffins[1]. Two features distinguish this phase from the other cubic phases: its position in the phase diagram encompassed by the hexagonal and the micellar phases (thus at a high water content), and the spacings ratios of the small-angle reflexions (see Table I).

We have previously reported[5] the space group of this phase, which was chosen according to the usual principle that the number of missing reflexions attributed to the systematic absences should be a maximum. An inspection of the X-ray diffraction diagrams, obtained with a variety of systems, leads to two possible space groups, $P\bar{4}3n$ and Pm3n (No. 218 and 223 of the International Tables[8]). The space group was since confirmed by single crystal analysis[7].

The subsequent steps in the structure analysis were guided by our previous experience with lipid–water systems. First, we assume that the structure elements (namely the regions occupied by the hydrocarbons or by the polar moiety) occupy special positions of the space group—indeed the shape of the structure elements is likely to be defined by the symmetry of the cell, since both the paraffin and the polar regions lack internal rigidity[1,3]. Second, we adopt the rule that the area per polar group at the paraffin–water interface never decreases as the water content increases, even when phase boundaries are crossed[1,4]. Third, we suppose that the distribution of water and paraffins is of Type I, namely, the paraffins being inside the structure elements (rods and spheres, see below) and water outside, on the grounds that in all the systems described here the order of the sequence in the phases with increasing water concentration—lamellar, cubic Ia3d, hexagonal, cubic Pm3n, micellar—is typical of structures of Type I (refs. 1, 4). Fourth, we assume that the two media —paraffin and water—are continuous through each crystal and are mutually entangled in a three-dimensional network, in keeping with the high viscosity and easy growth of large crystals, two properties characteristic of the cubic phases (see discussion in refs. 3 and 4).

The different sets of special positions of the two space groups may now be discussed (see International Tables[8]).

TABLE I

X-RAY DIFFRACTION DATA

The data were obtained with the system sodium caprylate–*p*-xylene–water. The spacings of the observed reflexions are in perfect agreement with a cubic lattice ($a = 75.0$ Å) and with the indices given in the table. The intensities were measured as discussed in ref. 13. I_{cal} takes the form: $I_{hkl} = m\,[F_1(hkl)\,f_1(s) + F_2(hkl)\,f_2(s)]^2 \exp(-\alpha s^2)$. m is the multiplicity factor, $F_1(hkl)$ is the structure factor of the framework of rods with gaps of length ε' and ε'' at the ends[10], $F_1(hkl) = 1/8 \int_{\varepsilon''/4l}^{1/4-\varepsilon'/4l} A_{hkl}\,(1/4, x, 1/2+x)\,dx$; $f_1(s)$ is the form factor of a long rod formed by a paraffin cylinder of radius R_{par} surrounded by a polar shell of radius R_{pol}: $f_1(s) = J_1(2\pi R_{pol}s)/\pi R_{pol}s - K_1 J_1(2\pi R_{par}s)/\pi R_{par}s$. $F_2(hkl)\,f_2(s)$ is the contribution of the spherical particles, formed by a paraffin core surrounded by a polar shell. $F_2(hkl)\,f_2(s) = K\,[\Phi(2\pi R_{pol}s) - K_2\Phi(2\pi R_{par}s)]$; $\Phi(x) = 3\,(\sin x - x\cos x)/x^3$; this contribution is $\neq 0$ only for $h + k + l = 2n$. The numerical values of the parameters are the following. The volume concentrations and the partial specific volumes of sodium caprylate, *p*-xylene and water are: 0.41–0.05–0.54; 0.908–1.16–0.968 $cm^3 \cdot g^{-1}$. The radii of the paraffin and polar shells are: $R_{par} = 9.0$ Å, $R_{pol} = 10.7$ Å for the rods; $R_{par} = 14.5$ Å, $R_{pol} = 15.9$ Å for the spheres. The lengths of the gaps are $\varepsilon' = 2.8$ Å, $\varepsilon'' = 4.9$ Å; the length of each rod is $l = a/\sqrt{8} = 26.5$ Å. The volume ratio of spheres to rods (contained in one unit cells) is $K = 0.20$. The adjustable parameters take the values: $K_1 = 0.82$; $K_2 = 0.60$; $\alpha = 1300$ Å^2. The I_{obs} are normalized assuming $\Sigma I_{obs} = \Sigma I_{cal}$.

hkl	*I*	
	Calc.	*Obs.*
110	100	60
200	390	275
210	1760	1520
211	620	1060
220	20	23
310	28	27
222	2	< 7
320	10	10
321	19	15
400	28	25
410	110	27
411 }	3	<10
330 }	1	
420	47	31
421	48	64

Positions *a*, *b*, *e*, *f* of P$\bar{4}$3n and positions *a*, *b*, *f*, *i* of Pm3n are discarded as they involve a restriction ($h + k + l = 2n$) clearly incompatible with the observed reflexions (see Table I). Similarly, position *e* of Pm3n is discarded (restriction $h, k, l = 2n$) as well as positions *c* and *d* of both space groups (for these, the reflexion [410] would be absent).

Positions *h* and *g* of both space groups correspond to a system of rods lying along 2-fold axes. Knowing the volume concentration and the parameter of the unit cell, the radius of the rods can be determined once their length is chosen. It turns out that, even in the most favourable case (infinitely long rods), the rule of S increasing for increasing water concentration is violated; for example, in the system sodium caprylate–*p*-xylene–water (see Table II), the area S for the rods would be 35 Å^2 in the cubic phase, as compared to 47 Å^2 in the hexagonal phase.

Position *k* of Pm3n allows the choice of two independent parameters and thus involves a large number of possibilities. Nevertheless, none of these is quite satisfactory, especially when the fourth condition is taken into account.

TABLE II

SOME DIMENSIONS OF THE CUBIC PHASE FOR DIFFERENTS SYSTEMS ($T = 22°$)

Φ_l and Φ_{par} are the volume concentrations of the whole lipid and of the paraffin part. $\bar{v}_l$ is the partial specific volume of the lipid. R is the radius of the rods and of the spheres. S is the area per polar group at the interface. In agreement with previous cases (see legends of Tables II and III in ref. 4) the internal volume is assumed to contain the whole soap molecules and the organic solvent in the first system (sodium caprylate–*p*-xylene) in which the polar moiety is of small size, and only the paraffin chains for the other lipids whose polar moieties are bulky. The volume and the surface of each rod, bevel-shaped to meet with two others at one end, with three others at the other end, have the expressions (see ref. 4); $v = \pi R^2 l\,(1 - 0.669\,R/l)$; $s = 2\pi Rl\,(1 - 1.05\,R/l)$, with $l = a/\sqrt{8}$ (length of one rod). Each unit cell contains 24 rods and 2 spheres.

	Sodium caprylate–p-xylene (ref. 6)		*Lysolecithin*		*Lauryl decaethyleneglycol*		*Dodecyltrimethyl-ammonium chloride (ref. 7)*	
	Cubic	*Hexagonal*	*Cubic*	*Hexagonal*	*Cubic*	*Hexagonal*	*Cubic*	*Hexagonal*
$\bar{v}_l$ (cm³/g)	0.950	0.950	0.937	0.937	1.00	1.00	1.00	
Φ_l	0.46	0.47	0.47	0.49	0.42	0.49	0.43	
Φ_{par}			0.19	0.20	0.14	0.17	0.31	
a (Å)	75	30	148	75	125	59	86	
R_{rods} (Å)	10.7	10.6	13.6	18.0	9.6	12.8	9.9	
S_{rods} (Å²)	47	47	49	41	71	56	62	
R_{sph} (Å)	15.9		21.3		14.4		14.8	
S_{sph} (Å²)	49		50		73		63	

Position *j* of Pm3n consists of a system of rods lying along 2-fold axes, linked together to form the three-dimensional network discussed below (see Fig. 1). But if the structure contained only this network the area per polar group would be too small as compared to the hexagonal phase (for example, $S = 39$ Å² for sodium caprylate, see Table II).

Since no single set of positions appears to be satisfactory, a more complex solution of the problem is sought, involving two sets of special positions. A quick inspection shows that the only pair of positions that meet all the conditions are *j* and *a* of Pm3n.

The structure is represented in Fig. 1. It contains a system of rods of finite length, all identical and crystallographically equivalent, joined three by three at one end and four by four at the other (position *j*), and a body-centred arrangement of spherical elements (or quasi-spherical, since the symmetry of position *a* is m3). The length of each rod is $a/\sqrt{8}$; each unit cell contains 24 rods and 2 spheres.

The structure can be described (see Fig. 1c) as a body-centred space-filling assembly of identical truncated octahedra. These polyhedra have eight hexagonal and six square faces. The rods sit on the hexagonal faces in positions that do not agree with a body-centred lattice. The cubic cell is thus primitive with two polyhedra per cell. The structure is in fact a chlathrate, formed by polyhedral cages, whose bars are the lipid rods, each cage enclosing one spherical micelle.

Assuming, as discussed above, that the rods and spheres are of Type I (namely that the paraffins are inside), the volume of rods and spheres contained in one unit cell can be determined when the chemical composition, the lattice parameter and the partial specific volumes are known (the partial specific volumes are supposed to

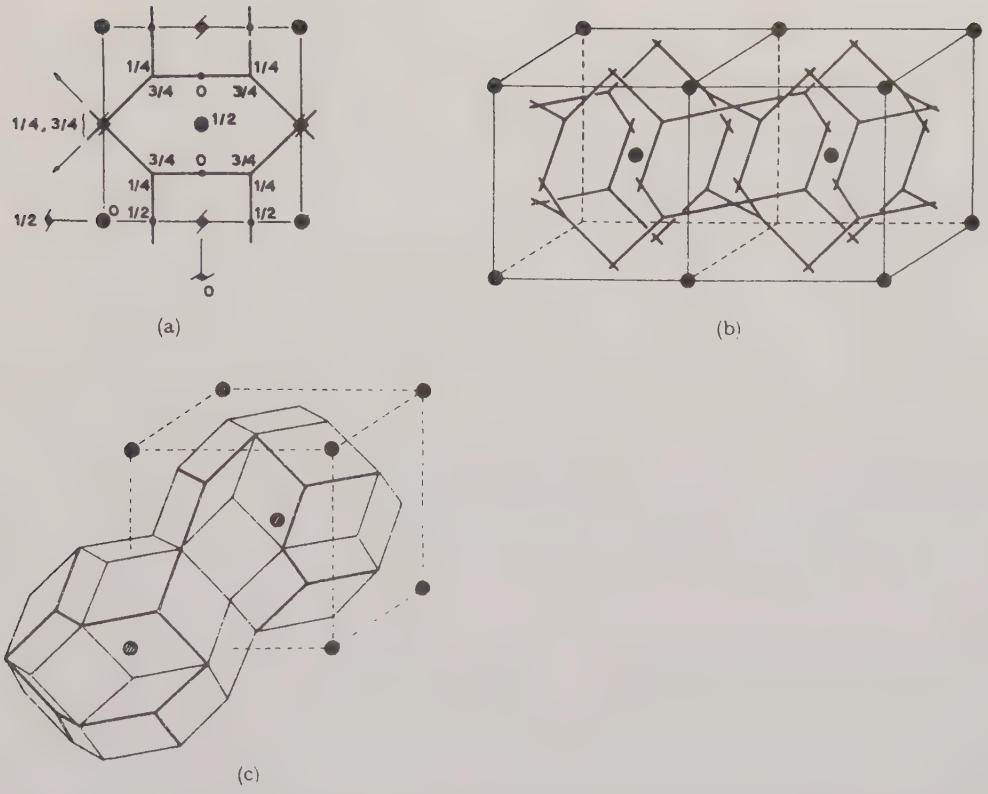


Fig. 1. Representation of the structure. In (a) and (b) the axes of the rods are represented by heavy bars, the limits of the unit cells by thin lines, the centers of the spheres by black circles. The rods are of finite length, and lie along two-fold axes. The rods are joined three by three at one end four by four at the other. The gaps at the ends of the rods (see text) are omitted. The interior of the rods and spheres is occupied by the paraffin chains, the external volume by the water. The rods and spheres are quite bulky, almost in contact with each other (see text and Table II). (a) Projection on the plane ab, with the position of some of the structure elements. The intersections of four rods are shown by dots. The fractional figures are the z coordinates of the intersections of the rods. (b) Perspective view of two unit cells. Note that the joining rods build up a three-dimensional network. (c) Front view of two cage-like truncated octahedra each enclosing a spherical micelle. The rods (heavy lines) sit on the hexagonal faces. Note that the packing of the polyhedra is space-filling body-centred; the position of the rods indicates that the unit cell is primitive, with two polyhedra per cell.

be independent of the shape of the structure element). The distribution of the lipids between the rods and the spheres is unknown: the dimensions given in Table II are determined by making the arbitrary assumption that in both elements the area per polar group takes similar values. It can be noted that the rods are of similar radius in the cubic and hexagonal phases, that the radius of the spheres is close to the fully extended length of the paraffin chains, in agreement with what is known for the micellar solutions[9], and that the area per polar group increases as the water content increases. It is clear that the agreement could be improved if the volume of the rods were increased, and the volume of the spheres decreased, thus allowing the area per polar group to be smaller in the rods than in the spheres (see Table II).

As an additional confirmation we have compared the observed and calculated structure factors for the system sodium caprylate–*p*-xylene–water. The electron density distribution is rather odd in this case since the rods and the spheres are bulky, and the contributions of the paraffin cores and of the polar groups must be taken into account (see discussion in ref. 4). The structure factors of the network of rods were calculated for thin rods with a short gap at each end, which takes into account the deformations at the intersections[3]. The length ε' and ε'' of the gaps is that of the rod segment whose volume is equal to the volume lost at the bevel-shaped end. The form factor of the rods is that of a uniform paraffin cylinder, surrounded by a cylindrical shell containing the polar groups of the lipids. The form factor of the spherical micelles is that of a uniform paraffin sphere surrounded by a polar spherical shell. The radii of the paraffin cores and of the polar shells of both the rods and the spheres are determined as discussed previously. The electron density of the polar regions is somewhat arbitrary because the precise space distribution of the counterions is not known[4]; the adjustable parameters K_1 and K_2 of Table I take into account this effect. The formulae and dimensions are given in Table I. The agreement of the observed and calculated intensities is quite satisfactory ($\Sigma|F_o-F_c|/\Sigma|F_o| = 0.19$), although it should be noted that this kind of verification is perhaps less conclusive here than in other cases[1,4], since the number of adjustable parameters is higher (K_1, K_2, α, see Table I).

This phase seems to be the first example in lipids of a structure containing elements of more than one form. Another phase containing two types of structure elements has been reported previously in mitochondria lipids (phase Lγ)[10], but in that case, both elements are lamellar. The presence of two types of structure elements may be postulated as a means of preserving an efficient surface/volume ratio while avoiding too large a separation of the structure elements. Indeed, the maximum distance between rods ($a\sqrt{3}/2$) is found along the 3-fold axes; rods and spheres are intercalated and almost in contact in that direction. The distance between rods along the 4-fold axes ($a/2$) is too short to leave room for a lipid-containing element (see Table II); the gap is filled by water. The structure is less compact than that of the other cubic phase, as the maximum volume concentration, corresponding to structure elements in contact, is 0.51 in this case, 0.874 in the other[4]. Besides, the presence of rods and spheres is a favorable feature for a phase bordered on one side in the phase diagram by the rod-containing hexagonal phase and on the other side by the isotropic solution which in these systems[9] most likely contains spherical micelles.

This structure may be compared to other structures formed by identical rods, all crystallographically equivalent. Several cases have been observed. (a) The rods are indefinitely long: the lattice is two-dimensional hexagonal[1]. (b) The rods are of finite length, and are joined three by three in one plane. Each rod and the four others joined to it may be coplanar: the structure consists then of two-dimensional hexagonal networks (phase R, refs 11 and 12). Otherwise the planes of the rods joining at both ends of a rod may be at right angles: in this case the structure is cubic as space group Ia3d (refs. 1–4). (c) The rods are of finite length, joined four by four. The rods may be coplanar: the lattice is tetragonal (phase T (ref. 12)). The four joining rods may be oriented tetrahedrally: the structure (space group Pn3m) was observed in phosphatidyl ethanolamine[5]. (d) The rods are of finite length, and are joined three by three at one end, four by four at the other: this structure is described in this work. The

packing of the rods is less compact than in the other cases, and leaves room for the spherical micelles and water.

As a final comment we wish to stress once more the paradox of a high degree of long-range order accompanied by a liquid-like short-range organization—the structure of most lipid–water phases can indeed be visualized as an ordered distribution of two liquid media, water and hydrocarbons, separated by a continuous surface covered by the polar groups of the lipid molecules. This class of structures appears to be characteristic of lipids, since it is not observed with any other type of chemical compounds. This peculiar distribution of long-range order and short-range disorder, and the remarkable polymorphism of lipids are likely to be related to the biological role of these substances; we have dealt with this question elsewhere[13].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. A. Klug for a critical reading of the manuscript and for several suggestions. This work was supported in part by a grant from the "Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire.

REFERENCES

1 V. Luzzati, in D. Chapman, *Biological Membranes*, Academic Press, New York, 1968, pp. 71–123.
2 J. S. Clunie, J. M. Corkill and J. F. Goodman, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 285 (1965) 520.
3 V. Luzzati and P. A. Spegt, *Nature*, 215 (1967) 701.
4 V. Luzzati, A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas and F. Reiss-Husson, *Nature*, 220 (1968) 485.
5 A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, F. Reiss-Husson, V. Luzzati and R. P. Rand, *Abstr. Brit. Biophys. Soc. Meeting on Biophysical Studies of Cell Membranes, Birmingham, 1969.*
6 K. Fontell, L. Mandell and P. Ekwall, *Acta Chem. Scand.*, 22 (1968) 3209
7 R. R. Balmbra, J. S. Clunie and J. F. Goodman, *Nature*, 222 (1969) 1159.
8 *International Tables for X-ray Crystallography*, Vol. I, Kynoch Press, Birmingham, 1952.
9 F. Reiss-Husson and V. Luzzati, *J. Phys. Chem.*, 68 (1964) 3504
10 T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas and V. Luzzati, *J. Mol. Biol.*, 27 (1967) 303
11 V. Luzzati, A. Tardieu and T. Gulik-Krzywicki, *Nature*, 217 (1968) 1028
12 V. Luzzati, T. Gulik-Krzywicki and A. Tardieu, *Nature*, 218 (1968) 1031.
13 V. Luzzati, T. Gulik-Krzywicki, A. Tardieu, E. Rivas and F. Reiss-Husson, in D. C. Tosteson, *The Molecular Basis of Membrane function*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1969, pp. 79–93.

C - ADDITIF AUX ARTICLES CONCERNANT LES PHASES A SYMETRIE CUBIQUE.

Plusieurs autres phases cubiques ont été observées dans divers systèmes lipide-eau.

a) - Par R.P. Rand (1970), dans un système Phosphatidyl éthanolamine-50% d'eau à Ph acide. La PE étudiée provenait d'insectes.

Les espacements des réflexions observées par rayons X sont dans le rapport :

$\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$, $\sqrt{10}$, $\sqrt{11}$, $\sqrt{12}$, $\sqrt{14}$, $\sqrt{18}$.

Ces réflexions ne peuvent être indexées que dans un réseau primitif, et on peut rendre compte de la plupart des réflexions absentes par le choix du groupe de symétrie Pn3m. (n° 224 des Tables Internationales). En prenant les mêmes hypothèses que précédemment, c'est à dire en particulier que les éléments de structure occupent des positions spéciales du groupe de symétrie, il n'y a qu'une solution possible : les positions e (voir tables). Les éléments de structure sont des tiges de longueur finie, cristallographiquement équivalentes, liées 4 par 4 en tétrahèdre. Ces tiges forment deux filets tridimensionnels de type diamant, mutuellement enchevêtrés et sans connexions, (voir fig. 2).

L'ordre de succession des phases lorsque la température décroit est Q, L, et par analogie avec les cas précédents, ceci est en faveur d'une structure de type II. Mais le problème est que la composition exacte en chaînes paraffiniques de ce composé n'est pas connue, et que la faible quantité de matériel disponible n'a pas permis d'explorer en détails les phases voisines. En estimant que les chaînes paraffiniques contiennent un nombre moyen d'atomes de carbone égal à 17, la surface calculée par tête polaire est de 70 $\mathring{A}^2$. Cette valeur est raisonnable, mais il faudrait pouvoir la comparer aux surfaces par tête polaire dans les phases voisines. Avec cette composition en chaînes paraffiniques, un calcul rapide montre un bon accord entre les intensités calculées et observées.

b) - Par Fontell, (1969), dans le lauryl décaéthylène glycolether contenant environ 50% d'eau.

Les espacements des réflexions observées sont dans le rapport

$\sqrt{1}$, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$.

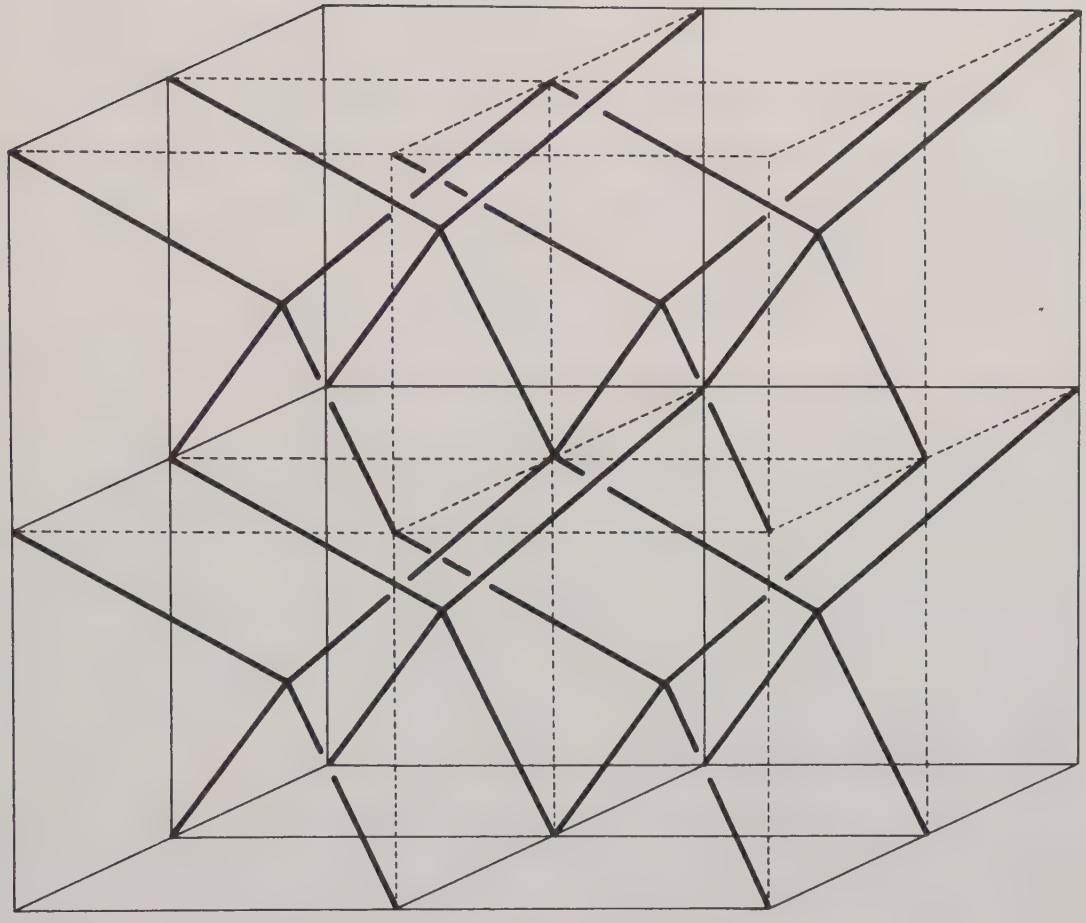


Fig. 2 - Représentation schématique de la structure. Le groupe de symétrie est Pn3m. Le contour des mailles élémentaires est représenté en traits fins. Les traits forts représentent la position du centre des tiges qui contiennent l'eau et les têtes polaires. Ces tiges sont situées le long d'axes de symétrie d'ordre 3, et sont liées quatre par quatre, formant deux filets de type diamant mutuellement enchevêtrés et sans connexions.

Le nombre de réflexions est ici trop faible pour permettre, ne serait-ce que la détermination du groupe de symétrie.

c) - Par E. Rivas (1971), avec des lipides extraits de Pseudomonas Fluorescens pour des concentrations en eau variant de 10% à 40% environ.

Les espacements des réflexions observées sont dans le rapport $\sqrt{3}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{11}$, $\sqrt{12}$, $\sqrt{16}$, $\sqrt{19}$, $\sqrt{24}$, $\sqrt{27}$, $\sqrt{32}$, $\sqrt{43}$, $\sqrt{44}$.

On peut rendre compte de la plupart des réflexions absentes par le choix du groupe de symétrie Fd3m.

Nous sommes en train d'étudier cette phase.

d) - Nous avons observé dans certains tritons en présence de solvant organique une phase cubique qui semble appartenir au même groupe de symétrie que celle observée par E. Rivas.

Il est probable que dans l'avenir d'autres phases à symétrie cubique soient encore observées.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Résumons les résultats les plus marquants de cette étude : Nous avons mis en évidence deux nouvelles classes de structures. Dans la première classe, les éléments de structure sont des bâtonnets qui peuvent être infiniment longs, organisés dans un réseau hexagonal bidimensionnel, ou de longueur finie, cristallographiquement équivalents, liés trois par trois ou quatre par quatre, pour former divers réseaux tridimensionnels. La structure est de type I si les bâtonnets sont remplis par des chaînes paraffiniques, et de type II dans le cas contraire. Nous avons montré que les structures des phases formées à haute température par les savons anhydres de cations divalents appartiennent à cette classe, ainsi que les structures des phases formées par divers lipides d'origine biologique dans la région sèche du diagramme de phase.(lécithines, galactolipides...). Dans ces exemples, les structures sont de type II. Nous avons déterminé la structure de la phase cubique formée par les savons monovalents dans la région hydratée du diagramme de phase comprise entre une phase lamellaire et une phase hexagonale, et nous avons montré que cette structure était identique à celle observée avec les savons anhydres de cations divalents, (Luzzati et Spegt, 1967), mais dans ce dernier cas la structure est de type I. Nous avons également déterminé la structure d'une autre phase à symétrie cubique appartenant à cette classe.

Dans la seconde classe de structures mise en évidence, les éléments de structure sont de deux sortes, des bâtonnets et des sphères. Nous n'en avons jusqu'à maintenant qu'un seul exemple, la structure de la phase cubique formée par quelques systèmes savon-eau, savon hydrocarbure eau, dans la région hydratée du diagramme de phase comprise entre une phase hexagonale et une phase micellaire.

Nous avons aussi caractérisé plusieurs phases à symétrie cubique.

Nous n'avons jusqu'à présent jamais mis en évidence de structure tridimensionnelle, dans laquelle les éléments de structure seraient uniquement des sphères.

Par l'ensemble de ces résultats, nous avons une fois de plus justifié l'emploi, dans la détermination des structures, d'un certain nombre d'hypothèses, qui découlent d'un ensemble d'observations dans les systèmes lipide-eau :

- Le groupe de symétrie doit être choisi de telle sorte que le nombre de réflexions absentes attribué à des absences systématiques, soit maximum.

- Les éléments de structure occupent des positions spéciales du groupe de symétrie (la forme des éléments de structure est stabilisée par la symétrie de la maille, étant donné que les régions paraffiniques et polaires manquent de rigidité interne).

- La surface par tête polaire à l'interface lipide-eau, ne peut décroitre lorsque la concentration en eau augmente ou lorsque la température s'élève, même lors des transitions de phase (S peut rester constante dans des régions assez étendues du diagramme de phases, ainsi S ou plutôt son équivalent N, nombre de cations par unité de longueur est pratiquement indépendant de la température dans les savons de cation divalents.

- La distribution des paraffines et de l'eau est de type I ou II suivant la séquence des phases observées lorsque la concentration en eau augmente. Type II si la succession des phases est H, Q, L, type I si la succession des phases est L, Q, H.

A partir de ces résultats et à partir d'autres résultats obtenus au laboratoire ou publiés par d'autres auteurs sur les systèmes savons-eau, lipides d'origine biologique-eau, on peut tenter de tirer quelques conclusions générales quant au comportement des lipides dans la région du diagramme de phases où les chaînes paraffiniques sont liquides.

Considérons tout d'abord, la région sèche. Dans cette région, toutes les structures observées peuvent être réparties en deux classes, la classe "lamellaire", et la classe "en bâtonnets". (Rappelons que dans la classe lamellaire, les groupes polaires sont localisés en lamelles, qui peuvent être des plans organisés dans des réseaux à une dimension, des rubans infiniment longs organisés dans des réseaux à deux dimensions, ou des disques organisés dans des réseaux à trois dimensions). Toutes les phases, formées par les savons anhydres étudiées jusqu'à présent, appartiennent à l'une ou l'autre classe, suivant la nature du cation : lamellaire pour les savons monovalents, en bâtonnets, pour les savons divalents. Les phases, observées avec des lipides d'origine biologique contenant 2 chaînes paraffiniques par tête polaire (4 dans les cardiolipides) appartiennent également à la classe "en bâtonnets".

L'hypothèse qu'il faut chercher ici la corrélation entre la composition chimique du lipide et le type de structure, dans l'organisation des têtes polaires, est encore renforcée par l'observation que la séquence des phases est spécifique de la nature de la tête polaire, et indépendante de la longueur de la chaîne paraffinique (sauf peut-être dans quelques cas extrêmes, chaînes très longues ou très courtes, voir les savons de sodium (Skoulios, 1959) par exemple). De plus, des arguments indirects suggèrent un grand degré d'ordre au niveau des têtes polaires dans toutes ces phases ; en effet dans les structures appartenant à la classe lamellaire, la valeur de la surface par tête polaire est indépendante de la température dans les rubans et les disques, et est semblable à la valeur de la surface par tête polaire dans les savons cristallins (dans les phases lamellaires observées à haute température, S est plus grand) et dans les structures appartenant à la classe "en bâtonnets" le nombre de têtes polaires par unité de longueur, est spécifique du cation, indépendant de la température et de la longueur de la chaîne paraffinique.

L'existence de rubans de largeur finie ou de disques, avait été expliquée (Skoulios et Luzzati, 1961) par la présence simultanée d'un arrangement cristallin des têtes polaires et d'une conformation désordonnée des chaînes paraffiniques : les chaînes tendent à occuper un volume plus grand que ne le permet, dans une lamelle, l'arrangement cristallin des têtes polaires. La formation de rubans permet de concilier ces 2 tendances. La formation de bâtonnets de longueur finie peut être expliquée de façon similaire : dans ce cas les chaînes paraffiniques tendent à rester plus proches les unes des autres qu'il n'est permis par la séparation des groupes polaires.

Si nous considérons maintenant la <u>région hydratée</u> du diagramme de phases, les lipides, selon leur comportement peuvent être classés en trois groupes. Les lipides appartenant aux deux premiers groupes, forment, dans la région peu hydratée, des phases dont la structure appartient à la classe "en bâtonnets". Différentes observations tendraient même à montrer qu'à haute température, l'existence d'une phase hexagonale de type II est la règle, du moins pour les lipides d'origine biologique. Lorsque la concentration en eau augmente, il y a formation d'une phase lamellaire Lα.

Avec les lipides appartenant au premier groupe, l'épaisseur de la

couche d'eau dans la phase Lα peut varier énormément, de 5 Å à plus de 250 Å, l'épaisseur de la couche lipidique restant constante. Les lipides appartenant à ce groupe possèdent tous des groupes ionisables. On peut citer : les lipides totaux de mitochondries, de globules rouges, les lipides polaires de chloroplastes, le phosphatidyl inositol, les cardiolipides, l'acide phosphatidique...

Avec les lipides appartenant au second groupe, l'épaisseur de la couche d'eau ne peut varier que très peu. De 5 Å à 25 Å environ. L'eau en excès forme une phase séparée, en équilibre avec la phase lamellaire au maximum d'hydratation. Les lipides appartenant à ce groupe sont tous dépourvus de charge électrique nette. Ce sont les lécithines, les monoglycérides, les cérébrosides, les glycolipides.

Les lipides appartenant au troisième groupe ne présentent jamais dans la région peu hydratée du diagramme de phases, de structures appartenant à la classe en bâtonnets.

Lorsque la concentration en eau augmente, on observe aussi une phase lamellaire Lα. L'épaisseur de la couche d'eau dans cette phase ne peut varier que dans des limites étroites (de 5 Å à 20 Å environ), l'eau en excès induit une transition de phase, les nouvelles phases formées appartiennent généralement à la classe en bâtonnets, mais cette fois, les éléments de structure sont de type I. Les savons et les détergents appartiennent à ce troisième groupe.

Ces propriétés de la phase Lα, sont liées au problème des forces responsables de la stabilité des phases observées dans les systèmes lipides-eau. Parmi les différents facteurs susceptibles de jouer un rôle, trois sont pris généralement en considération :

- les intéractions électrostatiques entre charges mobiles ou fixées,
- les forces de tension superficielle à l'interface lipide-eau.
- le comportement type "caoutchouc" des chaînes paraffiniques.

Nous avons pu mettre en évidence le rôle des interactions de type électrostatique (Gulik et al, 1969), en montrant que l'addition de lipides portant une charge nette (quelle que soit la charge) aux lipides du deuxième groupe, permettait de leur faire adopter un comportement analogue à celui des lipides du premier groupe. D'autres facteurs sont néanmoins susceptibles de jouer un rôle important, et il faut souligner la difficulté de rendre compte par les seules interactions électrostatiques, de la similitude de comportement

de deux lipides très différents au point de vue électrochimique, les lécithines (Zwitter-ions) et les monoglycérides par exemple (non ioniques). Un autre phénomène est assez difficile à expliquer, l'addition, aux lipides du troisième groupe d'acides gras ou d'alcools gras permet de leur faire adopter un comportement analogue à celui des lipides du premier groupe. Cet effet est ici obtenu par "dilution" des charges électriques des feuillets lipidiques, (alcool gras) ou par changement de l'environnement ionique, (acide gras).

Il est d'autre part manifeste que la nature chimique du lipide joue aussi un rôle. Ainsi, si les lipides appartenant aux deux premiers groupes peuvent avoir une ou plusieurs chaînes paraffiniques, les lipides du troisième groupe ne possèdent qu'une seule chaîne paraffinique.

On peut dire que le nombre de chaînes paraffiniques est en général déterminant pour le type de structure en bâtonnets observée. Le type II est observé avec les lipides contenant deux chaînes paraffiniques, (bien qu'on ait aussi observé des structures de type II avec les monoglycérides) (Larsson, 1967) et le type I avec les lipides contenant une chaîne paraffinique (Lysolecithine, savons). La taille de la partie polaire par rapport à la partie paraffinique joue également un rôle : dans les lipides appartenant aux deux premiers groupes, plus la partie polaire de la molécule est petite, et plus le domaine de la phase hexagonale type II peut être important (Phosphatidyl éthanolamine) et réciproquement, pour les lipides appartenant au troisième groupe, plus la partie polaire est petite, et plus le domaine de la phase lamellaire est étendu (avec la lysolecithine, on observe une phase hexagonale type I dans pratiquement tout le diagramme de phases).

Si l'on essaie maintenant d'examiner les phases à structure "en bâtonnets" (qu'elles soient de type I ou II) ou les phases dites "intermédiaires de savons"), (Luzzati et al, 1960), et tout particulièrement les phases à symétrie cubique, on est frappé par le nombre et la variété de structures observées. Il est difficile d'avancer des hypothèses sur les facteurs pouvant déterminer l'existence d'un si grand nombre de phases. Il est tentant de se représenter toutes ces phases comme une distribution de deux milieux liquides, l'eau et les paraffines, séparés par une surface couverte par les têtes polaires, et dont l'existence serait gouvernée par la possibilité de remplir un volume donné, tout en conservant une surface par tête polaire qui ne peut varier que dans d'étroites limites, c'est à dire en fait, d'attribuer leur

existence à des facteurs géométriques et des forces de tension superficielles. A l'appui d'une intervention non négligeable de "facteurs géométriques" on peut citer le fait que l'existence de certaines phases (cubique $Pm\bar{3}n$) dépend de la composition en chaînes paraffiniques, et le fait que l'on observe une phase T et non R dans un savon de strontium à longue chaîne, le fait surtout que dans les savons (de potassium principalement) (Luzzati et Husson, 1962) le nombre de phases observées dans la région hydratée dépend fortement de la longueur de la chaîne, même si l'ordre de succession des phases reste identique. Toutes ces phases se présentent comme des phases ayant entre elles des différences d'énergie libre très faibles, et de faibles variations des composants, (longueur de la chaîne, addition d'impuretés, etc...) peuvent suffire pour induire des transitions de phase. A cet égard il est vraisemblable que l'étude d'autres systèmes lipides-eau conduise à la découverte d'autres structures.

Rappelons enfin quelques résultats concernant les "mélanges" ; lorsqu'un lipide est un mélange de différentes espèces chimiques, celles-ci sont parfaitement miscibles dans des régions étendues, à une phase, du diagramme de phases. Dans les régions où plusieurs phases sont en présence, une ségrégation partielle de ces différentes espèces peut avoir lieu entre ces différentes phases.

L'insaturation et l'hétérogénéité des chaînes paraffiniques abaisse la température de transition, (Tc) à laquelle elles deviennent ordonnées.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA LECITHINE D'OEUF ET D'UNE SERIE HOMOLOGUE DE LECITHINES SYNTHETIQUES, DANS LA REGION DU DIAGRAMME DE PHASES OU LES CHAINES PARAFFINIQUES SONT PARTIELLEMENT OU TOTALEMENT ORDONNEES.

INTRODUCTION

Il est connu, que dans la région hydratée du diagramme de phases où les chaînes paraffiniques sont rigides, la séquence des phases observées, dépend à la fois de la nature de la tête polaire (Vincent et Skoulios, 1966a, b et c), et de la composition en chaînes. Pour ce dernier point en particulier, l'étude des lipides totaux de mitochondries (Gulik et al, 1967) a permis de montrer que si l'hétérogénéité n'empêche pas les chaînes paraffiniques d'adopter une conformation rigide et de se mélanger dans des domaines à structure ordonnée dans des régions étendues du diagramme de phases, elle peut donner lieu à une organisation graduelle des chaînes, ou, dans certaines conditions, à des phénomènes de ségrégation des différentes espèces lipidiques. Afin de préciser le rôle de l'hétérogénéité au niveau des chaînes, il était intéressant d'étudier des fractions lipidiques ne différant que par leur composition en chaînes paraffiniques. Nous avons pu étudier une série homologue de lécithines synthétiques allant de la lec diC10 à la lec. di C18 ; ainsi qu'une lec. comportant deux chaînes paraffiniques de longueur différente, la lec C 10 C18, grâce à F. Reman, du laboratoire du Pr. Van Deenen, qui a synthétisé ces différents produits. Le choix des lécithines semblait judicieux, car une étude préalable de la lécithine d'oeuf et de quelques échantillons de lécithines synthétiques avait déjà permis de mettre en évidence un polymorphisme remarquable dans la région sèche du diagramme de phases, et des différences de comportement, dans la région hydratée, dépendant de la composition en chaînes. (Etudes faites au laboratoire sur la lec. d'oeuf et la lec. di C16, et données de la littérature sur la lec. di C16, Chapman, 1967, Levine 1970).

Les diagrammes de phase de la lec. d'oeuf et des lec. synthétiques sont identiques (voir fig. 3) dans la région où les chaînes paraffiniques sont liquides, c'est à dire au dessus d'une température Tc qui dépend de la concentration en eau du système et de la longueur des chaînes paraffiniques des composés étudiés. La structure des phases observées ayant déjà été décrite, nous n'y reviendrons pas.

Différentes phases ont été caractérisées dans la région du diagramme de phases où les chaînes paraffiniques sont partiellement ou totalement or-

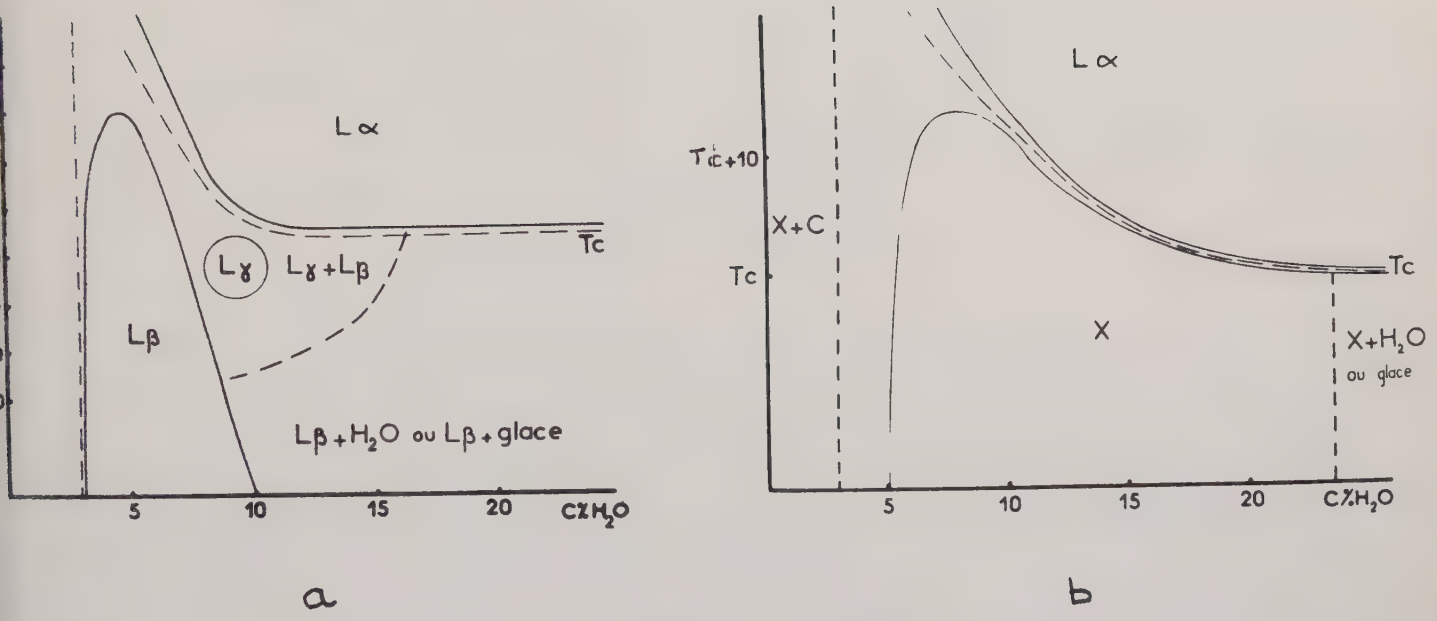


Fig. 3 - Diagramme des phases, a) de la lécithine d'oeuf, b) des lécithines synthétiques di C2n. Nous n'avons pas représenté ici le diagramme de phases de la région sèche. Celui-ci est identique pour toutes les lécithines étudiées, et a déjà été donné dans l'article "Polymorphism of lecithins". Les limites des phases pures sont représentées en traits pleins. Au dessous de la ligne Tc, les chaînes paraffiniques sont rigides. Dans b), X représente la phase Lβ' pour les lécithines diC16 et diC18, et la phase Pβ' pour les lécithines diC14 et diC12. Le diagramme de phases de la lécithine C10C18, qui présente des caractéristiques particulières, sera donné lors de l'étude de cette phase.

données. On peut en fait distinguer deux régions :

I - Concentration en eau comprise entre 3 % et 25% environ.

(pour des concentrations en eau $>$ à 25% l'excès d'eau constitue une phase séparée en démixtion avec la phase qui contient 25% d'eau.).

Dans cette région le comportement des lécithines dépend fortement de la composition en chaînes paraffiniques.

On peut distinguer 4 comportements :

- A) - Lécithine d'oeuf
- B) - Lécithine synthétique di C2n avec 2n $>$ 14
- C) - Lécithine synthétique di C2n avec 2n $\leq$ 14
- D) - Lécithine synthétique CIO CI8

Les phases observées diffèrent à la fois par l'organisation des chaînes paraffiniques et par le type et la symétrie des réseaux. Leurs structures seront décrites dans une Ière partie.

II - Concentration en eau inférieure à 3%.

Dans cette région toutes les lécithines se comportent de façon identique. Le fait de disposer d'une série homologue a été d'un grand secours dans l'étude des structures, en particulier de la phase cristalline. Les résultats seront présentés en seconde partie.

CHAPITRE I : ETUDE DE LA REGION HYDRATEE DU DIAGRAMME DE PHASES.

A - ETUDE DE LA LECITHINE D'OEUF. $T < Tc$, $3\% < C\ H_2O < 20\%$

Les domaines d'existence des phases pures sont portés sur la fig. (3). Deux phases sont lamellaires, Lβ, Lγ, une autre est la glace. Les régions intermédiaires contiennent deux ou trois phases.

a) - Phase lamellaire de type Lβ.

Une phase de ce type a déjà été observée avec d'autres lipides d'origine biologique, lipides totaux de mitochondries, Phosphatidyl éthanolamine, acide phosphatidique.

Les diagrammes de diffraction comportent une huitaine de réflexions lamellaires aux petits angles, et une raie fine et intense dans la région des chaînes paraffiniques à $s_I = (4{,}2\ \mathring{A})^{-I}$ suivie de deux raies faibles à $s_2 = \sqrt{3}\ s_I$ et $s_3 = 2s_I$, caractéristiques d'une organisation rigide à symétrie hexagonale des axes des chaînes paraffiniques.

Le domaine d'existence de cette phase est limité, à une petite région du diagramme des phases, entre 3 et 9% d'eau environ. On observe généralement aux petits angles une raie supplémentaire indiquant que la phase n'est pas tout à fait pure, mais l'intensité de cette raie reste toujours très faible.

La distance de répétition lamellaire varie de 60 $\mathring{A}$ à 63 $\mathring{A}$. Connaissant les volumes spécifiques, et en supposant que la concentration en eau du système est voisine de celle de la phase, on trouve que l'épaisseur du feuillet lipidique est de 58 $\mathring{A}$.

La comparaison de S et Σ, ($\Sigma = 20{,}4\ \mathring{A}^2$, $S/2 \neq 20{,}4\ \mathring{A}^2$) indique que les chaînes paraffiniques sont perpendiculaires au plan du feuillet. Les chaînes paraffiniques étant de longueur inégale, l'existence, au centre du feuillet d'une mince couche à structure désordonnée, est probable.

La vérification cristallographique de ce type de phase ayant été faite dans le cas des lipides totaux de mitochondries, nous n'y reviendrons pas. Le modèle de cette phase est représenté en fig. 4 .

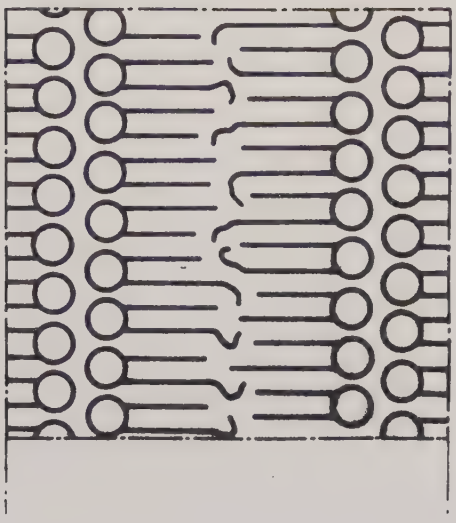


Fig. 4 - Représentation schématique de la structure de la phase lamellaire Lβ. Cette représentation est extraite de l'article sur les lipides totaux de mitochondries (Gulik et al, 1967).
Les chaînes paraffiniques sont rigides, ordonnées selon un réseau hexagonal à deux dimensions. La présence d'une mince couche désordonnée, au centre du feuillet paraffinique, est due à l'hétérogénéité de longueur des chaînes paraffiniques.

b) - Phase lamellaire de type L_γ

Cette phase n'existe que pour un domaine de concentration en eau et de température très étroit, autour de 10% d'eau et de 0°C. Elle n'est non plus jamais observée tout à fait pure.

Les diagrammes de diffraction X comportent une dizaine de réflexions lamellaires fines aux petits angles correspondant à une période de 114 Å, et une raie à $s = (4{,}2\ \text{Å})^{-1}$ aux grands angles. L'épaisseur de la couche lipidique est de 100 Å. Une phase de ce type a également été observée avec les L.T.M.

Une épaisseur lipidique aussi élevée, indique que la structure est complexe, elle contient ou bien deux types de feuillets différents, ou bien un type de feuillets assymétriques empilés avec les demi feuillets équivalents en regard (voir fig. 5).

La première hypothèse avait été retenue lors de l'étude des L.T.M. et la structure proposée consistait en l'empilement alterné de feuillets de type α et de feuillets de type β ; En fait il est difficile de faire un choix entre les deux hypothèses, toutes deux permettent de rendre compte des intensités observées.

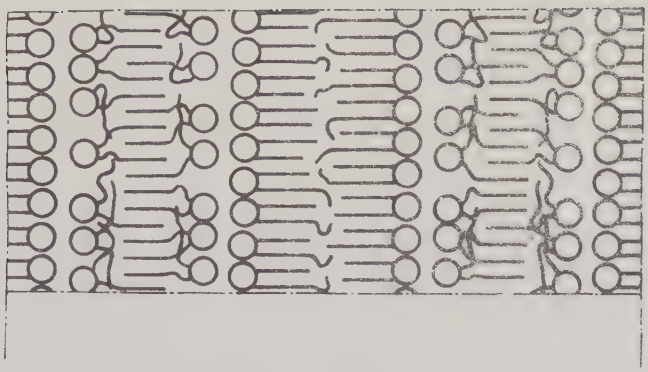
De toutes façons une telle structure ne peut manifestement s'expliquer que par un fractionnement des différentes espèces de molécules lipidiques entre les deux types de feuillets ou de 1/2 feuillets. Ceci est confirmé par le fait que la phase L_γ n'a jamais été observée avec des lipides homogènes au point de vue tête polaire et chaînes paraffiniques.

Lors de l'étude des L.T.M. une question était restée en suspens, à savoir si une telle ségrégation était due principalement aux têtes polaires ou aux chaînes paraffiniques, nous voyons ici que l'hétérogénéité au niveau des chaînes paraffiniques est suffisante.

B - ETUDE DES LECITHINES SYNTHETIQUES di C2n, $2n > 14$. $T < Tc$, $3\% < c < 25\%$.

On observe une phase pure, que nous avons appelée $L\beta'$.

L'étude de cette phase a été faite par Levine (1970) sur des échantillons orientés, de faible épaisseur, de lécithine di C16. Nous présentons ici une étude basée sur l'interprétation de diagrammes de poudre de la phase $L\beta'$ observée avec les lécithines diC16 et diC18. Certaines conclusions étant évidentes à tirer des clichés orientés, nous n'avons pas cherché à les réta-



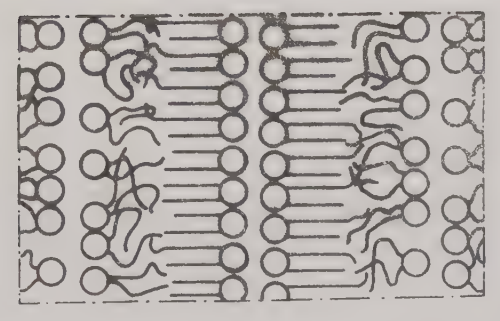


Fig. 5 - a) Modèle pour la phase L_γ, formé de feuillets Lα et Lβ alternés. Lα est représentée dans sa forme "basse température", avec une partie des chaînes rigides et ordonnées sur une partie de leur longueur. Cette figure est extraite des "lipides totaux de mitochondries", (Gulik et al, 1967).

b) Modèle pour la phase L_γ, formé de feuillets mixtes Lα et Lβ empilés avec les demi feuillets équivalents en regard. Cette figure est extraite de la thèse de troisième cycle de J.L. Ranck.

blir à partir des diagrammes de poudre, et nous avons alors utilisé les résultats de Levine. Ceci sera indiqué dans le texte au fur et à mesure. Nous avons particulièrement insisté sur les informations supplémentaires que peuvent donner, dans ce cas particulier, les diagrammes de poudre.

Les diagrammes de diffraction des rayons X présentent une série de réflexions lamellaires aux petits angles, et une raie fine suivie d'une bande, autour de $(4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$. Cette raie sera comme d'habitude attribuée aux paraffines rigides et étirées, présentant un désordre rotationnel autour de leur axe, l'organisation dans un plan perpendiculaire à leur axe étant à symétrie hexagonale. Nous reviendrons plus tard sur la signification de la bande observée autour de $(4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$. Cette phase est observée pure pour des concentrations en eau variant de 6% environ jusqu'à 25%. Pour des concentrations en eau inférieures à 6% on observe la phase cristalline ou une démixtion phase cristalline, phase Lβ'. Pour des concentrations en eau supérieures à 25% on observe une démixtion entre la phase Lβ' contenant environ 25% d'eau et l'eau en excès. (Fig. 6).

On constate que l'épaisseur du feuillet lipidique diminue régulièrement (voir table III) lorsque la concentration en eau augmente. Connaissant cette épaisseur et la densité du lipide, il est possible de calculer pour chaque concentration la valeur de la surface par tête polaire S. La comparaison de S/2 et de Σ permet de déterminer l'angle fait par l'axe des chaînes paraffiniques avec la normale au plan de la lamelle.

Nous avons trouvé que cet angle augmente en fonction de la concentration en eau jusqu'à un maximum, pour c = 25% d'environ 32° pour la lécithine di C16, et d'environ 40° pour la lécithine di C18. Avec la lécithine di C16, Levine avait trouvé que cet angle augmentait en fonction de la concentration en eau jusqu'à un maximum, pour c = 20%, d'environ 28°, et demeurait constant pour des concentrations en eau supérieures à 20%. De faibles erreurs, d'un côté ou de l'autre, sur la détermination de la concentration en eau, suffisent à expliquer ces divergences. Les angles limites trouvés sont de toutes façons peu différents, 28° et 32°.

La technique utilisée par Levine lui permet d'observer cette phase depuis des concentrations en eau de l'ordre de 2%, apparemment en état métastable. Ce qui lui permet de montrer que l'angle minimum est de 0°.

Cette phase est toujours statistiquement uniaxe. A partir des clichés de rayons X obtenus, il est impossible de dire si l'orientation des

Fig. 6 - Clichés de diffraction des rayons X de la phase Lβ'. Lecithine diCI6, c_{H2O}=0.80, a) T=33°C, b) T=4°C . Les raies fines centrales sont les ordres successifs relatifs à l'espacement 6I,5A°. Il faut noter que le position et l'intensité de ces raies sont pratiquement indépendantes de la température, par contre, dans la région autour de s=(4.2 Å)$^{-I}$, la distance raie bande augmente considérablement lorsque la température décroit.

TABLE III - PHASE Lβ'.

	C_{H_2O}	dT Å	dL Å	S/mole $Å^2$	θ
Lec di C16	6%	57,7	54	42,4	15°
	10,6%	57,0	50,7	45,6	26°
	17,8%	60,5	49,2	46,8	29°
	20%	61,5	48,6	47,4	30°
	25%	64	47,4	48,6	32°?

	C_{H_2O}	dT Å	dL Å	S/mole $Å^2$	θ
Lec di C18	10%	63	56,5	44,6	23°
	17%	63	52	48,4	32°
	22%	63	48,5	52	38°
	29%	67	47	53,4	40° ?

θ : angle entre l'axe des chaînes et la normale au plan des lamelles.

Comme la quantité d'eau maximum incorporée dans la phase n'est connue qu'à quelques % près, la valeur maximale de θ indiquée dans ce tableau est peut être surestimée.

chaînes peut se conserver dans plusieurs lamelles consécutives, autrement dit, de donner une "distance de corrélation" pour l'orientation des chaînes.

L'étude de ce type de phase lamellaire ayant été faite en détail par Levine, en particulier par l'utilisation des synthèses de Fourier pour la détermination du profil de densité électronique, nous nous sommes contentés de calculer dans quelques cas les facteurs de structure à partir d'un modèle, et de comparer les intensités observées et calculées.

Ce modèle est formé de trois régions de densité électronique constante, correspondant respectivement à la région de localisation des groupes CH_3, à la couche paraffinique, (groupes CH_2), et à la partie polaire. Connaissant l'épaisseur de la couche lipidique, et les valeurs des volumes spécifiques partiels des composants, les paramètres de ce modèle sont définis sans ambiguité pour chaque concentration en eau. (voir Fig. 7). Les intensités calculées avec ce modèle, ont été corrigées par une gaussienne, dont la valeur dépend de la concentration en eau du système, pour tenir compte de l'agitation thermique.

L'accord des intensités observées et calculées pour C_{H2O} = 18 % et C_{H2O} = 25 %, (Table 4) est tout à fait satisfaisant. Il est évident qu'on pourrait en faisant par exemple varier l'hydratation des groupes polaires, obtenir un accord encore meilleur. Nous n'avons pas cherché à le faire, il nous a paru plus intéressant de montrer qu'un modèle très simple, dont le seul paramètre est la valeur de la gaussienne, permettait de rendre compte des intensités observées.

Ce cas précis se prête particulièrement bien à l'étude de la diffraction due aux chaînes paraffiniques, et de plus, il est possible de chercher s'il existe une contribution des têtes polaires à la diffraction observée dans la région des "grands angles", donc d'apprécier le "désordre" au niveau des têtes polaires dans une telle phase.

Le calcul de la diffraction due aux chaînes est fait en assimilant celles-ci à des tiges de longueur finie. Dans un plan qui leur est perpendiculaire, ces tiges forment un réseau hexagonal. Au réseau des chaînes d'une lamelle, correspond donc dans l'espace réciproque, un autre ensemble de tiges, le facteur de structure le long d'une tige du réseau réciproque correspondant à la transformée de Fourier de la densité électronique le long d'une tige de l'espace réel. Le facteur de structure calculé pour une tige de l'espace réel d'une longueur de 35 Å est représenté en Fig. 8a).

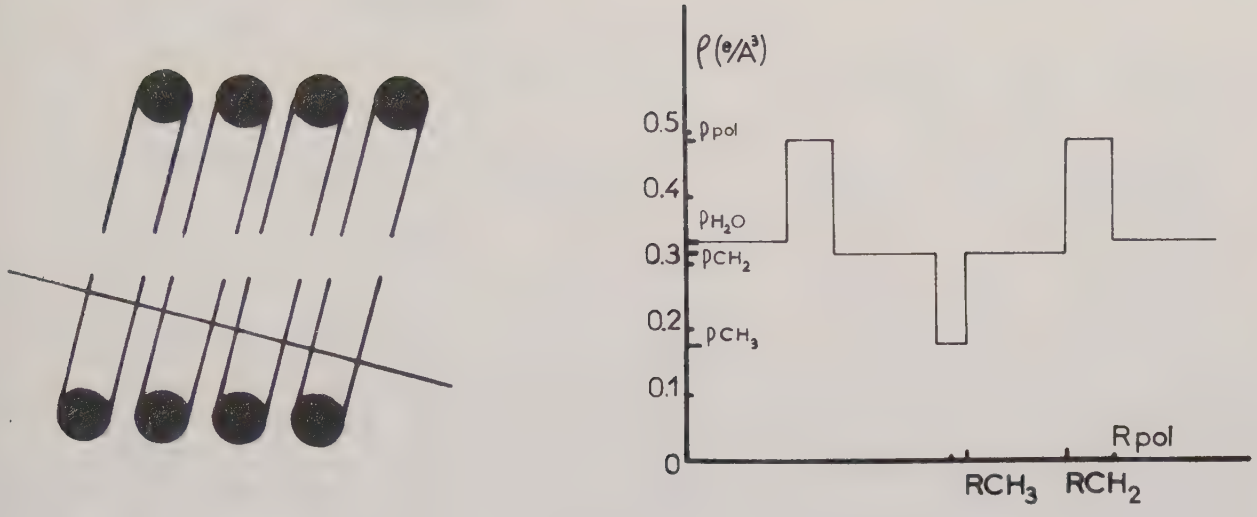


Fig. 7 - Représentation de la phase Lβ' et du modèle de densité électronique correspondant. Les chaînes paraffiniques sont rigides, et dans un plan qui leur est perpendiculaire, organisées selon un réseau hexagonal à deux dimensions. Les chaînes sont inclinées par rapport à la perpendiculaire au plan des lamelles, et l'angle d'inclinaison augmente lorsque la concentration en eau augmente.

Pour c = 18% d'eau les paramètres calculés de ce systèmes sont les suivants :

$\rho_{pol} = 0.486$ e/Å^3 $\quad \rho_{CH_2} = 0.314$ e/Å^3 $\quad \rho_{CH_3} = 0.177$ e/Å^3

$2\,R_{pol} = 49.2$ Å $\quad 2\,R_{CH_2} = 34.8$ Å $\quad 2\,R_{CH_3} = 4.3$ Å

TABLE IV - PHASE Lβ' - COMPARAISON DES FACTEURS DE STRUCTURE OBSERVES ET CALCULES.

C_{H_2O} = 18%		
h	Iobs	I calc
1	32,4	31,7
2	21,4	21,4
3	15,6	15,6
4	19,4	21,8
5	7,2	6,7
6	2,7	1,8
7	6,4	6,3
8	0	1,9
9	6,8	1,8

C_{H_2O} = 25%	
Iobs	Icalc
37,2	32,8
31,1	31,0
18,3	18,1
14,4	15,4
12,4	12,1
0	2,8
6,0	3,4

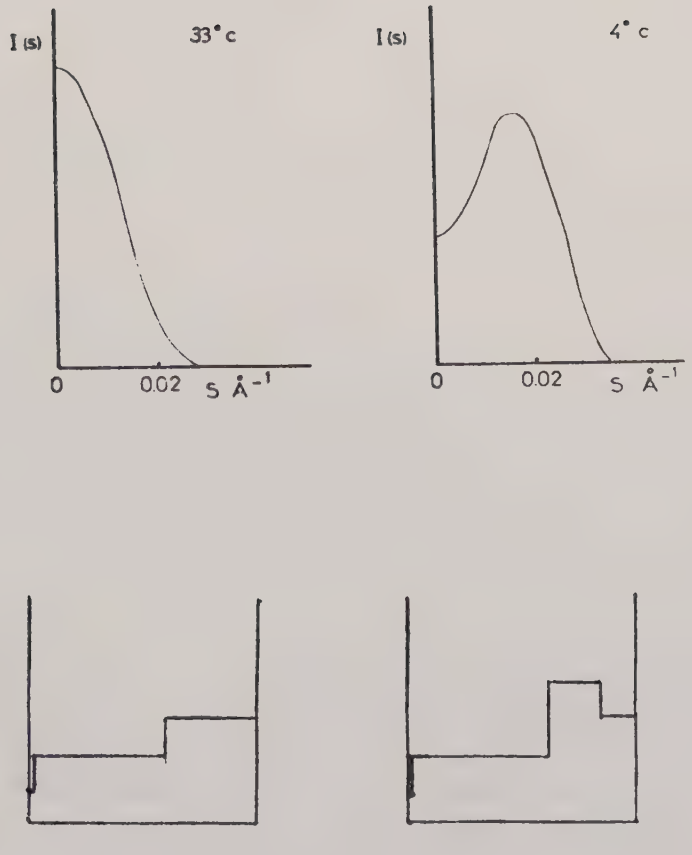
$I_{calc} = (F(S))^2 \; e^{-\alpha S^2}$

où $F(S) = \int_{feuillet} (\rho(z) - \rho(0)) \cos 2\pi sz dz$ et la distribution de la densité électronique $(\rho(z) - \rho(0))$ est représentée en Fig. (7).

Pour C_{H_2O} = 18%, α = 125 ; pour C_{H_2O} = 25% α = 230.

Le calcul des intensités a été fait en prenant l'eau ($\rho(0)$) comme niveau de référence, et en négligeant la contribution des groupes CH_2 puisque ρ_{CH_2} est très proche de ρ_{H_2O}.

a



b

Fig. 8 - Représentation du profil de densité electronique le long d'une tige paraffinique de l'espace réel, et du carré du facteur de structure correspondant le long d'une tige du réseau réciproque. a) seules les chaines paraffiniques interviennent, leur longueur totale a été prise égale à 35 Å, et l'on a rendu compte de la localisation des groupes CH_3 par une fonction δ . b) Même graphique que dans le cas précédent, en suppcsant que 60% des têtes polaires interviennent.

Lorsque les chaînes sont perpendiculaires au plan de la lamelle, le lieu du centre des tiges est le cercle equatorial de la sphère de réflexion correspondante, les tiges étant tangentes à la sphère de réflexion (voir Fig.9). Pour un échantillon orienté, on obtiendra donc une réflexion équatoriale, à $s_1 = (4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$. Pour calculer le profil de la raie observée sur un cliché de poudre, il faut intégrer l'intensité répartie dans l'espace réciproque, à une distance comprise entre s_1 et $s_1 + ds$ du centre (voir Fig 9) Le profil calculé de la raie pour un réseau de chaînes paraffiniques de longueur totale 35 $\mathring{A}$ est représenté en Fig. 10 . Cette longueur correspond au cas où les chaînes paraffiniques du demi feuillet supérieur et du demi feuillet inférieur diffractent de façon cohérente. Dans ce calcul, on a rendu compte de la localisation des groupes CH_3 par une fonction δ . Si les deux demi feuillets ne diffractent pas de façon cohérente, c'est à dire peuvent glisser l'un par rapport à l'autre, la largeur à mi hauteur de la raie peut être multipliée par un facteur 2 ou 3 mais cette largeur demeurera néanmoins très faible.

Dans ce calcul, comme dans le calcul suivant les intégrales de l'intensité répartie dans l'espace réciproque à une distance comprise entre s et s + ds du centre, ont été évaluées graphiquement.

Lorsque les chaînes sont inclinées par rapport au plan de la lamelle et si l'orientation des chaînes dans une lamelle est indépendante de l'orientation des chaînes dans la lamelle adjacente, la diffraction due aux chaînes, sera équivalente à la diffraction due à un "cristal" de chaînes, tournant autour de la perpendiculaire au plan des lamelles.

Pour un échantillon orienté, le lieu des centres des tiges sera composé des cercles de la sphère de réflexion d'égale latitude par rapport au plan équatorial (voir Fig. 11). Les tiges dont les centres sont situés sur des cercles "extra" équatoriaux, ne sont plus tangentes à la sphère de réflexion et les réflexions extra équatoriales sont élargies. De même dans un diagramme de poudre, la réflexion à $(4{,}2\ \mathring{A})^{-1}$ due à ces tiges sera élargie. L'intensité totale due à une tige extra équatoriale sera également répartie de part et d'autre de s_1, mais dans des domaines ds inégaux ; entre s'_1 et s''_1 (voir Fig. 11) le profil de la raie sera donc asymétrique, si le facteur de structure le long de la tige de l'espace réciproque passe par un minimum pour $s = s_1$, on pourra même observer deux réflexions dissymétriques par rapport à s_1.

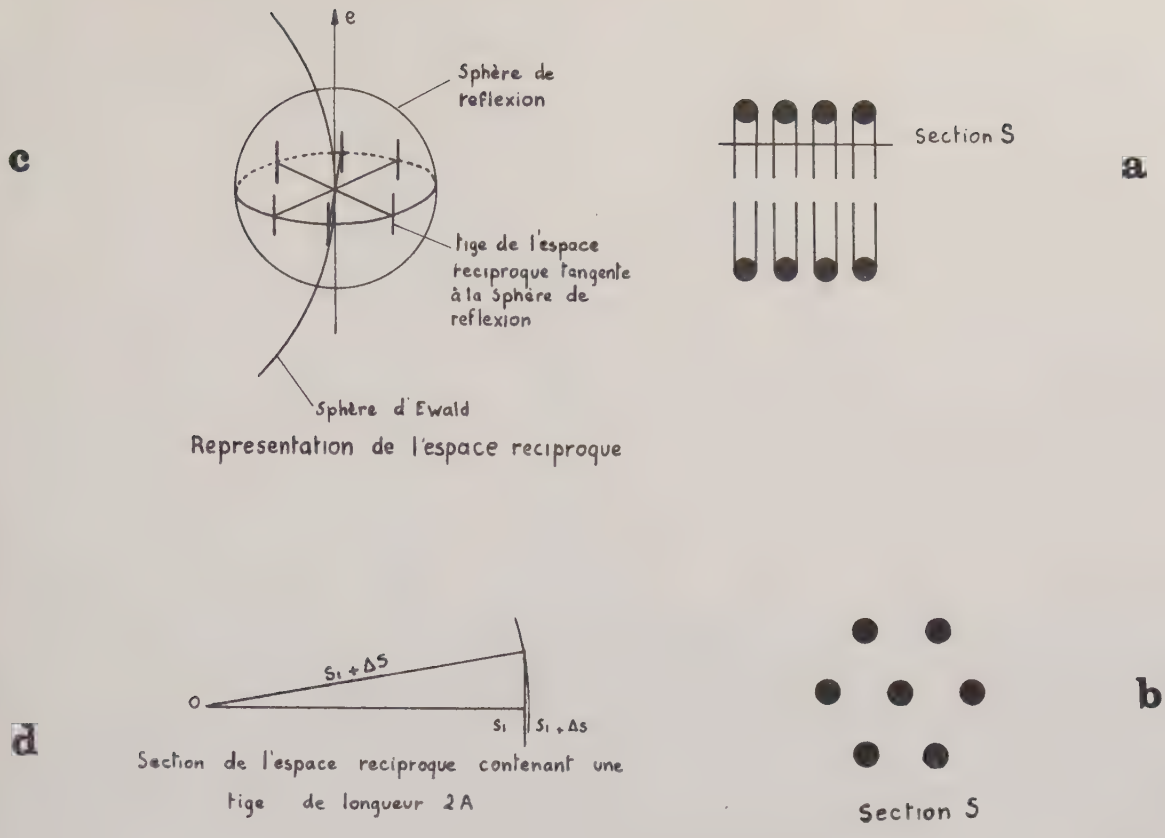


Fig.9. Les chaines paraffiniques sont perpendiculaires au plan des lamelles. Représentation a) d'une lamelle dans l'espace réel. b) de l'organisation des chaines paraffiniques dans un plan perpendiculaire à leur axe. c) de l'espace réciproque correspondant dans le cas d'un échantillon orienté, les lamelles étant placées tangentiellement au faisceau de rayons X. Au réseau des chaines paraffiniques de l'espace réel, correspond dans l'espace réciproque un ensemble de tiges tangentes à la sphère de reflexion, que nous avons représentées ici comme étant de longueur finie, car le facteur de structure le long de ces tiges devient rapidement très faible. d) Plan de section principale contenant une tige. Pour calculer le profil de la raie on se place dans l'un de ces plans de section. On connait alors la valeur de s pour tout point x se déplaçant le long de la tige, et on peut déterminer graphiquement le profil de la raie pour un facteur de structure quelconque le long de la tige.

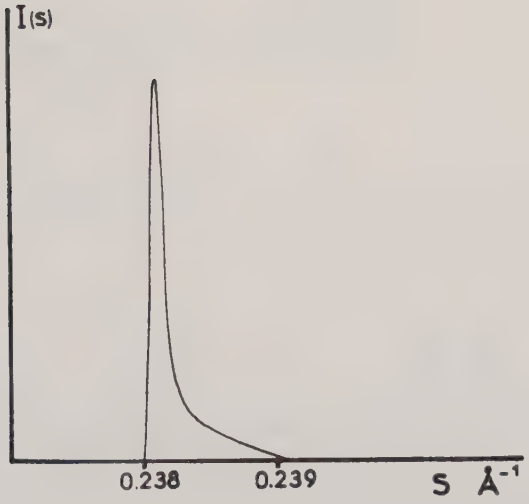
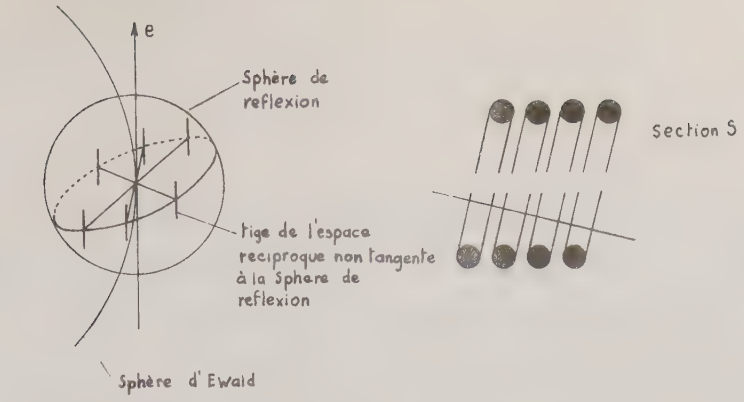


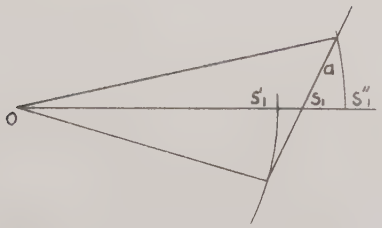
Fig.10- Profil de raie calculé pour une tige de l'espace réciproque tangente à la sphère de réflexion . Ce profil a été déterminé graphiquement à partir du facteur de structure représenté en fig. 8 a.



C

A

Representation de l'espace reciproque



D

Section S

B

Section de l'espace reciproque contenant une tige 2a non tangente à la sphère de reflexion

Fig.11- Même schéma que précedemment, dans le cas où les chaines paraffiniques sont inclinées par rapport à la normale au plan des lamelles. Toutes les tiges de l'espace réciproque ne sont plus équivalentes, deux tiges sont tangentes à la sphère de réflexion, et quatre tiges sont non-tangentes. c) représente une section de l'espace réciproque contenant une tige de longueur 2a non tangente à la sphère de réflexion. L'intensité observée due à cette tige, sera donc répartie entre s'_I et s''_I. Ceci est à comparer avec la schéma précédent, où l'intensité était répartie entre s_I et $s_I + ds$.

Les clichés d'échantillons orientés de Levine, présentent 2 réflexions équatoriales, et 4 réflexions extra équatoriales, centrées sur $(4,2\ \mathring{A})^{-1}$ (2 tiges de l'espace réciproque sont donc tangentes à la sphère de réflexion, et 4 tiges sont non tangentes). Ces résultats indiquent :

- que dans un plan perpendiculaire aux axes des chaînes, la symétrie hexagonale est conservée.

- que le réseau plan rectangulaire centré formé par l'intersection des axes des chaînes avec le plan de la lamelle, ne dépend que de l'angle d'inclinaison des chaînes par rapport à la lamelle.

- qu'il existe une distance interréticulaire qui se projette en vraie grandeur sur le plan de la lamelle, et c'est a $\sqrt{3}/2$.

D'autre part, ces clichés permettent une mesure indépendante de l'angle d'inclinaison des chaînes. L'angle ainsi déterminé pour c = 20% d'eau étant de 28°.

Les clichés de poudre, plus intenses, présentent une bande étroite à $s_1 = (4,2\ \mathring{A})^{-1}$, suivie d'une bande plus large. La réflexion fine peut être attribuée aux tiges de l'espace réciproque tangentes à la sphère de réflexion, tandis que la bande plus large est attribuée aux tiges, non tangentes à la sphère de réflexion. L'intensité de la bande due à ces tiges non tangentes, n'est pas répartie également de part et d'autre de $s_1 = (4,2\ \mathring{A})^{-1}$. Ceci indique que l'inclinaison des axes des chaînes s'accompagne d'une déformation du réseau hexagonal dans les plans perpendiculaires aux axes des chaînes. Cette déformation est néanmoins très faible, nous avons évalué que pour une concentration en eau de 20% et à 33°, l'intensité était répartie également de part et d'autre de $s = (4,16\ \mathring{A})^{-1}$.

A température constante, la largeur de la bande augmente lorsque la concentration en eau augmente, ce qui est en parfait accord avec la variation de l'inclinaison des axes des chaînes. A concentration en eau constante, la distance entre les maxima raie bande, augmente lorsque la température décroit. La figure 12 montre les densitométries de cet ensemble raie bande pour un échantillon contenant 20% d'eau, à 33° et 4°. Les maxima de la raie et de la bande sont pratiquement confondus à 33°, tandis qu'il existe un minimum entre raie et bande à 4°. Cette variation peut s'expliquer par une déformation du réseau hexagonal lorsque la température décroit, ou par une variation du facteur de structure le long des tiges du

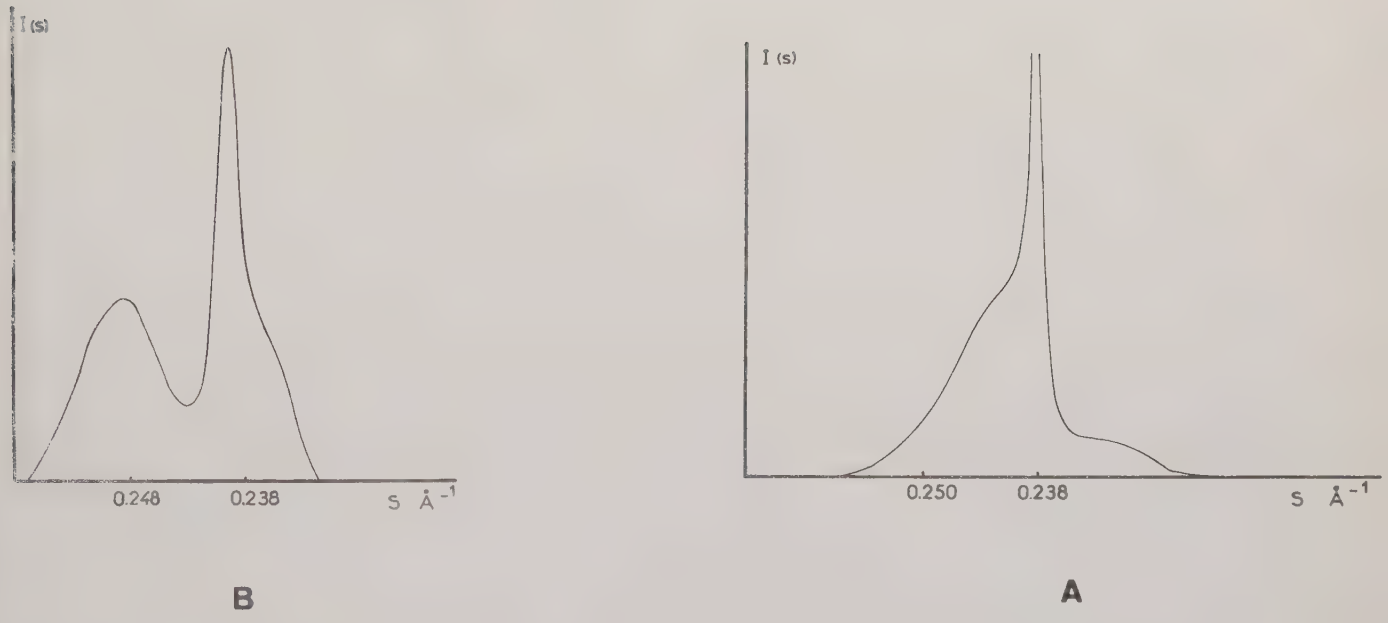


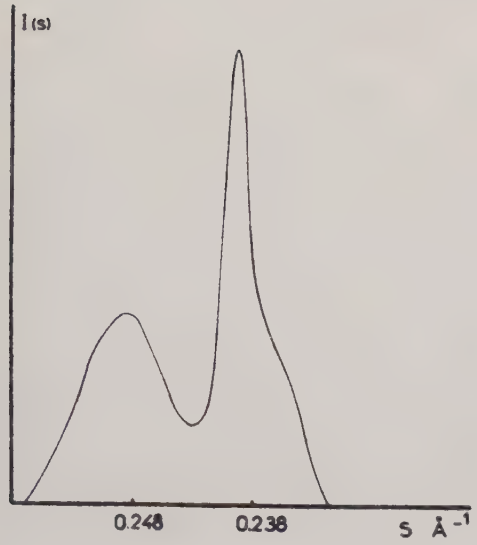
Fig.12- Densitométries des clichés de diffraction des rayons X, dans la région autour de $s=(4,2\mathring{A})^{-I}$, d'un échantillon de lecithine diCI6, contenant 20% d'eau.
a) à 33°C, b) à4°C.

réseau réciproque, ou même par les deux. Nous n'avons pas retenu l'hypothèse d'une simple déformation du réseau hexagonal, car dans cette hypothèse le profil de la raie due aux tiges tangentes ne devrait pas varier, or ce profil est différent à 33° et 4° (voir Fig. 12). Il semble donc que la seule explication raisonnable pour la variation de l'intensité de diffraction observée autour de s_1, soit une variation du facteur de structure le long des tiges du réseau réciproque en fonction de la température. Cette variation peut s'expliquer par une variation de la contribution des têtes polaires. Dans cette phase, les têtes polaires occupent des positions relativement fixes, du fait de l'empilement compact des chaînes, mais l'on suppose ces positions distribuées au hasard sur le plan de la lamelle, du fait qu'on n'a jamais observé par rayons X aucun indice d'organisation périodique des têtes polaires. Celles ci peuvent néanmoins effectuer des "mouvements" autour de leurs positions fixes. Si l'amplitude des mouvements dépend de la température, à basse température, tout ou partie des têtes polaires, relativement figés, interviennent dans le calcul des facteurs de structure, à haute température, le mouvement des têtes polaires augmentant, les chaînes paraffiniques interviennent pratiquement seules dans le calcul des facteurs de structure.

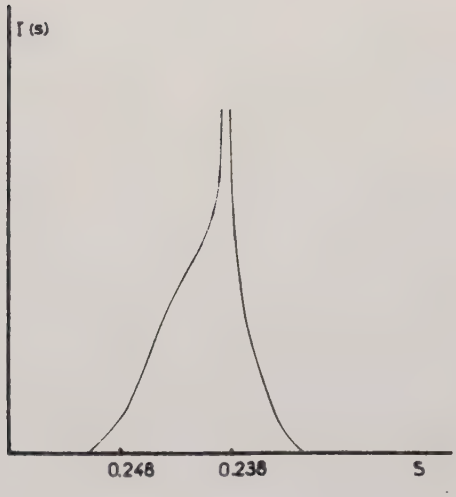
Les profils des raies ont donc été calculés en partant des hypothèses suivantes :

- les chaînes paraffiniques du demi feuillet supérieur et du demi feuillet inférieur diffractent de façon cohérente.
- seules les chaînes paraffiniques interviennent dans le calcul des facteurs de structure à 33°C.
- une partie des têtes polaires intervient dans le calcul des facteurs de structure à 4°C. (Nous avons cherché quel est le pourcentage de contribution des têtes polaires qui rend le mieux compte des intensités observées).
- l'angle des axes des chaînes par rapport à la normale au plan du feuillet est égal à 30°.

Les courbes calculées sont représentées en Fig. 13 . L'accord entre courbes calculées et observées est très bon si à 33°C les tiges non tangentes sont centrées sur $(4{,}16\ \mathring{A})^{-1}$, et si à 4°C la contribution des têtes polaires est de l'ordre de 60%, et les tiges non tangentes centrées sur $(4{,}14\ \mathring{A})^{-1}$.



b



a

Fig.13- Diffraction calculée dans la région autour de $s=(4,2\mathring{A})^{-I}$, due à deux tiges du réseau réciproque tangentes à la sphère de réflexion et quatre tiges non tangentes. L'angle d'inclinaison des chaines par rapport au plan des lamelles a été pris égal à 30°. a) Le carré du facteur de structure le long d'une tige du réseau réciproque est celui représenté en fig. 8a . Les tiges de l'espace réciproque tangentes à la sphère de réflexion sont centrées sur $s=(4,2\mathring{A})^{-I}$, et les tiges non tangentes sont centrées sur $s=(4,I6\mathring{A})^{-I}$. b) Le carré du facteur de structure le long d'une tige du réseau réciproque est celui représenté en fig. 8b . Les tiges du réseau réciproque tangentes à la sphère de reflexion son centrées sur $s=(4,2\mathring{A})^{-I}$, et les tiges non tangentes sont centrées sur $s=(4,I4\mathring{A})^{-}$

Comme précédemment le profil des raies a été déterminé graphiquement, les facteurs de structure le long des tiges du réseau réciproque, qui ont été utilisées sont représentés en Fig. 8 . Ce calcul n'est évidemment pas d'une grande précision. L'angle d'inclinaison des chaînes n'est connu qu'à $\pm$ 2°, on a supposé des chaînes placées dans le prolongement l'une de l'autre, et une distribution homogène de matière le long de l'axe des chaînes ; ces deux dernières hypothèses ne sont certainement valables qu'en première approximation. Nous pensons néanmoins, que l'accord des valeurs observées et calculées permet d'affirmer que toutes les chaînes paraffiniques ont même orientation et sont cohérentes à l'intérieur d'un feuillet. En effet, supposer qu'elles peuvent prendre deux orientations symétriques par rapport au plan des CH_3, (Fig. 14) reviendrait en première approximation à avoir des tiges de longueur moitié dans l'espace réel, donc de longueur double dans l'espace réciproque. La précision du calcul suffit à éliminer cette hypothèse.

Il apparait donc que dans cette phase les groupes CH_3 occupent des positions fixes. La tentation est grande d'attribuer l'inclinaison des chaînes à l'organisation de ces groupes. En effet, le volume occupé par un groupe CH_3 est double du volume occupé par un groupe CH_2 ; la localisation de tous les groupes CH_3 dans un même plan doit donc entrainer des "tensions" importantes, qui seraient contrebalancées par l'inclinaison des chaînes paraffiniques. Il existe un fait expérimental, qui, du fait qu'il peut être interprété facilement dans le cadre de cette hypothèse, tendrait à la confirmer : l'addition de quelques % de décane à la lécithine di C16, (le décane se place au milieu du feuillet lipidique) suffit pour obtenir une configuration des chaînes de type β au lieu du type β'. Ce qu'on peut exprimer de la façon suivante, il suffit d'éviter l'encastrement des groupes CH_3 pour passer d'une configuration de type β' à une configuration de type β, tandis que l'addition d'un composé ayant même longueur de chaîne, (CTAB) ne perturbe en rien la phase $L\beta'$.

Enfin cette phase possède une autre caractéristique intéressante, les éléments de structure ne sont en fait pas des plans indéfinis, mais des lamelles présentant des "ondulations" périodiques. (comme des tôles ondulées en quelque sorte). Nous reviendrons sur ce point lors de l'étude de la phase $P\beta'$.

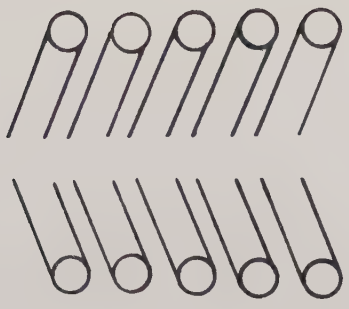


Fig. 14 -

C - LECITHINES di C_{2n}, $2n \leq 14$, $T < Tc$ $5\% < c < 25\%$.

On observe une seule phase pure, que nous avons appelée Pβ'.

Les diagrammes de diffraction des rayons X présentent aux petits angles une série de réflexions fines, dont trois ou quatre réflexions lamellaires prédominantes, et aux grands angles, une raie suivie d'une bande autour de $(4{,}2\ \mathring{A})^{-I}$. Nous avons vu que cet ensemble raie bande, était caractéristique d'une organisation de type β' des chaînes paraffiniques. Les réflexions observées aux petits angles peuvent toujours s'indexer dans un réseau oblique à deux dimensions. Le côté a de la maille correspond à la distance de répétition lamellaire, le côté b, de même que l'angle γ varient en fonction de la concentration en eau, de la longueur de la chaîne paraffinique, mais semblent indépendants de la température (voir table V). La distance de répétition lamellaire est proche de ce qu'on s'attendrait à observer, si ces composés donnaient des phases lamellaires de type Lβ'.(voir Fig. 15).

Si l'on admet que dans cette phase toutes les chaînes paraffiniques sont ordonnées, le seul modèle que l'on puisse concevoir pour la structure de cette phase consiste en l'empilement ordonné de lamelles infiniment longues dans une direction, et présentant des perturbations périodiques dans la direction perpendiculaire. Le problème devient délicat lorsqu'on essaie de préciser la nature de ces perturbations. Le fait que l' intensité des réflexions d'indice k soit systématiquement différente de l'intensité des réflexions d'indice -k, semble indiquer que l'orientation moyenne des lamelles dans cette phase, n'est pas parallèle à l'axe Y de la maille. On peut dans ce cas construire deux modèles extrêmes (voir fig. 16). Dans l'un les lamelles présentent des dislocations périodiques, dans l'autre, les lamelles présentent des "ondulations périodiques". Nous avons essayé, à partir des données de Rayons X de calculer l'amplitude de ces "dislocations" ou "ondulations". Ce calcul est explicité à la fin du chapître. Dans le cas de la lécithine dilauryl, nous avons trouvé une amplitude de l'ordre de 15 $\mathring{A}$. Ceci exclut la possibilité de l'existence de véritables dislocations (modèle A). En effet, une dislocation de cette ampleur mettrait en contact de l'eau et des paraffines, ce qui est exclu par hypothèse. Pour cette raison,

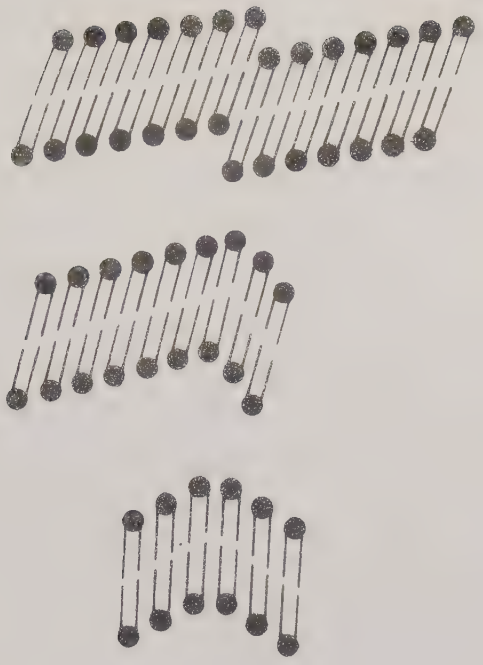
TABLE V - PHASE Pβ'.

	C_L	a	b	γ	angle d'inclinaison des chaînes	T
lécithine di C14	0.83	57.8 Å	175 Å	78°	21°	19°C
	0.79	56.2 Å	150 Å	81°	30°	
	0.75	58.3 Å	144 Å	86°	32.5°	
lécithine di C12	0.82	52 Å	113 Å	70°	23°	- 7°C
	0.77	52 Å	79 Å	70°	30°	

L'angle d'inclinaison des chaînes par rapport au plan des lamelles, ne peut dans ce cas être calculé avec précision. L'angle donné dans ce tableau est un angle minimal, calculé en supposant des lamelles sans déformation, parallèles à OY.

Dans le domaine de température exploré, (jusqu'à -10°C environ) ces dimensions sont indépendantes de la température.

Fig. 15- Cliché de diffraction des rayons X de la phase Pβ', observée avec la lecithine dilauryl. C_{H2O}= 0.77, T= -10°C.



A

a

B

b

Fig.16-A) Modèle avec "dislocations", B) Modèles avec "ondulations". Dans ce dernier cas il peut exister a) deux angles d'inclinaison des chaines par rapport au plan des lamelles, ou b) un seul angle d'inclinaison. Dans les deux cas A et B, nous avons supposé que les chaines paraffiniques étaient contenues dans le plan de section.

nous n'avons donc pris en considération que des modèles de type B, et nous avons également postulé qu'il existait deux angles d'inclinaison de l'axe des chaînes par rapport au plan des lamelles. En effet, si l'on ne postule qu'un angle d'inclinaison (voir fig. 16), on comprend mal, pour des raisons de symétrie, que la maille ne soit pas rectangulaire. Ce modèle dépend évidemment de plusieurs paramètres, l'angle d'inclinaison de l'axe des chaînes par rapport au plan des lamelles, l'orientation des lamelles par rapport aux axes de la maille, qu'il est difficile de préciser. Nous avons essayé de les évaluer dans le cas de la lécithine dilauryl contenant 23% d'eau. Ce calcul est explicité à la fin du chapître. On obtient un bon accord des facteurs de structure observés et calculés, pour le profil des lamelles représenté en fig. 17 . Avec ce modèle on peut expliquer le fait que les mailles observées sont obliques, et que la direction de l'axe y de la maille peut être différente de la direction des axes des chaînes. La différence peut provenir du fait que le système contient de l'eau. (Table VI).

Ces lamelles présentant des perturbations ont été observées par cryodécapage. La lécithine di myristoyl a été étudiée par Ververgaert (Fig.18) et la lécithine di palmitoyl par Pinto da Silva (1971). La similitude des clichés indique que dans les deux cas, les éléments de structure sont identiques. La périodicité des perturbations observée par cryodécapage est de l'ordre de 200 Å pour la lécithine di C14, et de l'ordre de 400 Å pour la lécithine di C16. Toutes les lécithines, homogènes au point de vue de la composition en chaînes paraffiniques, s'organisent donc en lamelles présentant des ondulations. Lorsque ces chaînes sont suffisamment courtes, les corrélations entre lamelles sont suffisantes pour permettre la formation de réseaux bidimensionnels. Lorsque la longueur de la chaîne augmente, on n'observe plus que des réseaux à une dimension, ceci pouvant s'expliquer par un affaiblissement des corrélations ou par l'absence de périodicité stricte des ondulations lorsque la longueur de la chaîne paraffinique augmente.

L'existence de ces "ondulations" peut provenir de l'antagonisme tête polaire, partie paraffinique, le rôle de l'un ou de l'autre étant tour à tour prépondérant. Plutôt que de chercher un compromis, le système préfère sans doute accumuler des tensions et les relacher périodiquement dans une "ondulation".

Il faut remarquer qu'un modèle dont les éléments de structure se-

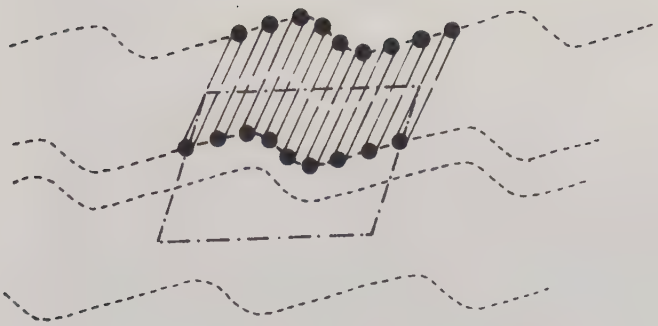


Fig.17- Représentation schématique de la phase Pβ'.

-.-. Contour de la maille élémentaire à deux dimensions.

---- Trace des lamelles ondulées dans le plan de section.

Les valeurs des paramètres (dimension de la maille, angle d'inclinaison des chaines, amplitude de "l'ondulation") sont celles données dans le tableau VI. Nous avons en f fait représenté ici un réseau à trois dimensions. C'est à dire que nous avons supposé des corrélations de position entre les molécules de deux lamelles consécutives. Bien que l'existence de ces corrélations soit vraisemblable , les données de rayons X ne permettent pas de dire si elles existent réellement ou si deux lamelles consécutives sont libres de glisser l'une par rapport à l'autre.

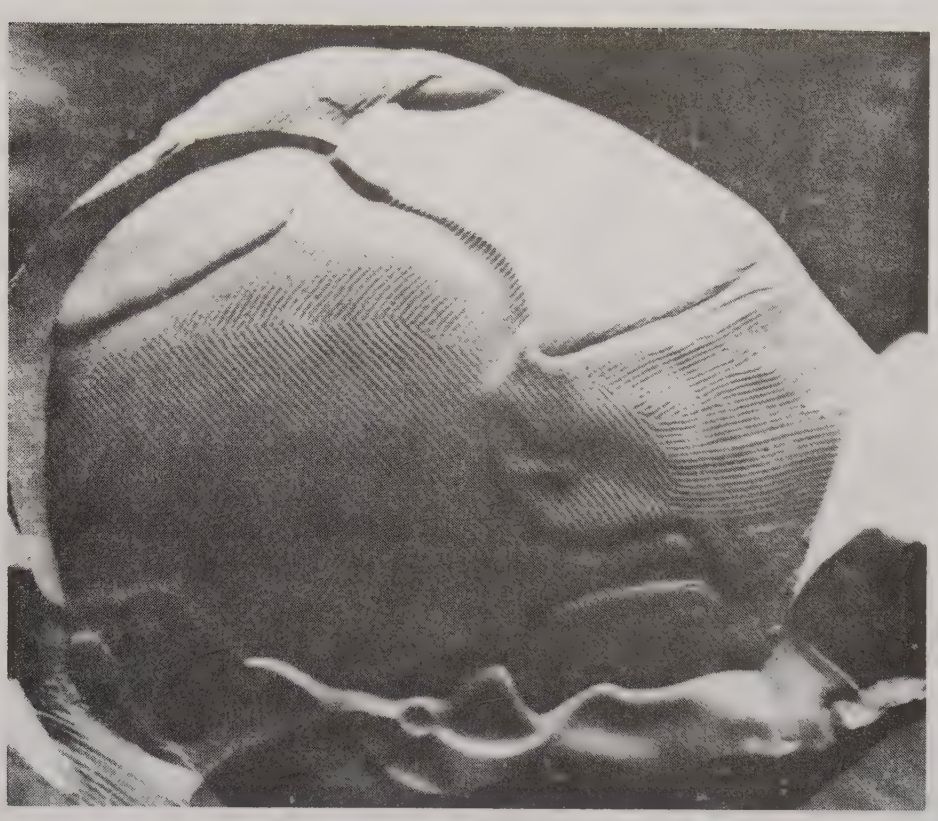
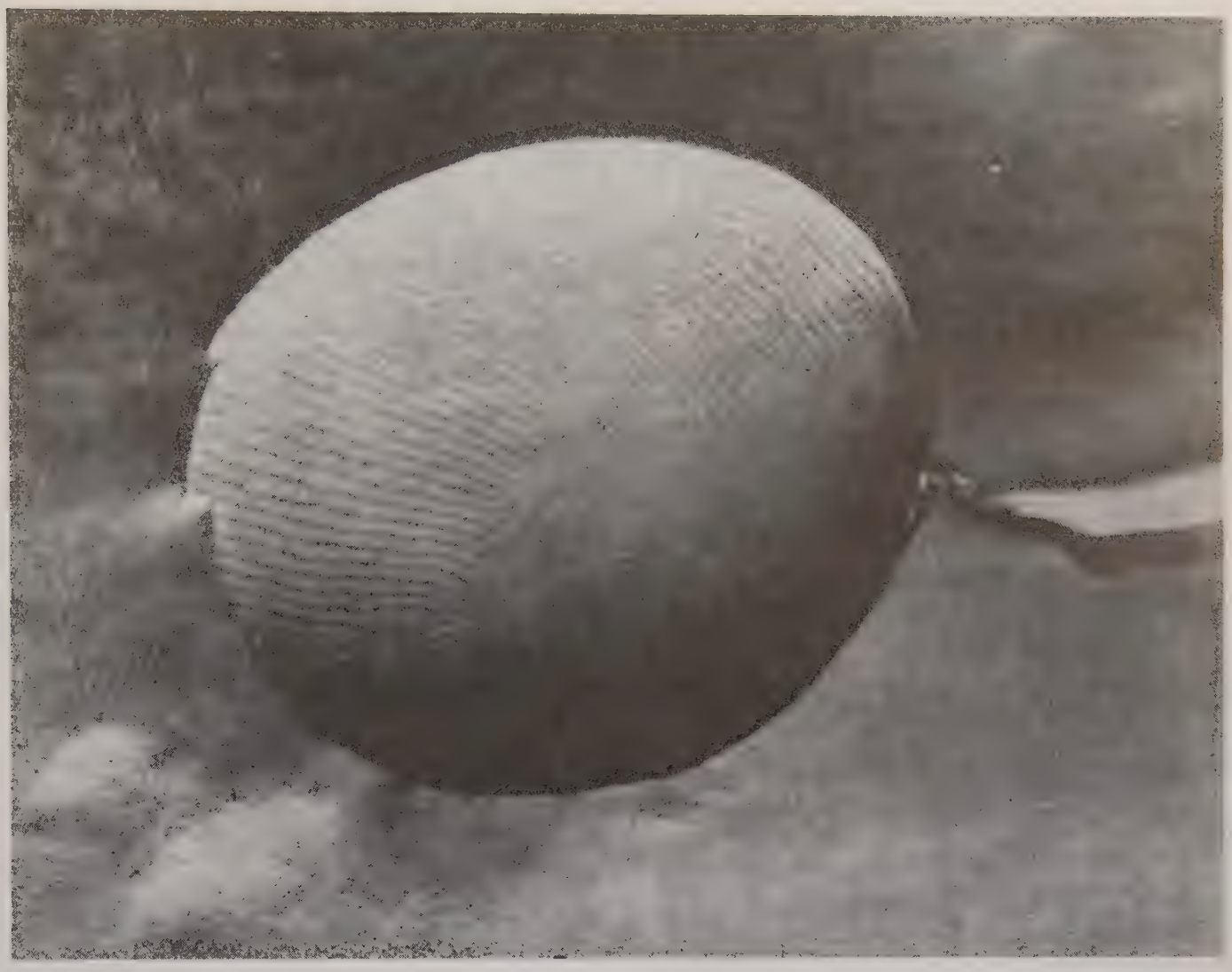


Fig. I8 - Cryodécapage de vésicules de lécithine dimyristoyl dispersées dans l'eau. La périodicité des perturbations observées est de 200 Å. La lécithine dipalmitoyl présente un aspect similaire, la périodicité des perturbations étant alors de l'ordre de 400 Å.
(ce cliché est extrait de Elbers et Ververgaert, (I972)).



Cryodécapage de lécithine dipalmitoyl.
(Pinto da Silva (1972))

TABLE VI - PHASE Pβ' - COMPARAISON DES INTENSITES CALCULEES ET OBSERVEES.

hk	I_{obs}	I_{calc}
01	30	1
10) 11)	1426	1950
02	10	1
$1\bar{1}$) 12)	45	98
$1\bar{2}$) 21)	510	165
20) 22)	1340	720
$2\bar{1}$	365	300
$2\bar{2}$	48	80
31) 32)	365	292
30	33	164
$3\bar{1}$	94	135
$3\bar{2}$	70	30
41	92	555
40	58	33

Le calcul des intensités est explicité en Appendice.

raient de véritables rubans, permettrait également de rendre compte des intensités observées ; nous n'avons pas retenu cette hypothèse pour deux raisons, ce modèle exige une hypothèse supplémentaire, à savoir qu'une partie des chaînes est dans un état liquide au niveau des jonctions, afin d'éviter le contact eau paraffine, et d'autre part, les observations de cryodécapage, ne semblent compatibles qu'avec l'hypothèse d'une continuité de la région paraffinique.

D - ETUDE DE LA LECITHINE C10 C18. $T < Tc$. $3\% < C < 40\%$.

Deux phases lamellaires Lα et Lβ, en démixtion, sont observées. Il n'existe aucune région du diagramme de phases, contenant une phase pure.

Depuis 17°C jusqu'à -30°C, les clichés de rayons X présentent deux séries de réflexions lamellaires aux petits angles, et aux grands angles une raie à $(4,2\ \mathring{A})^{-1}$, plus une bande à $(4,5\ \mathring{A})^{-1}$.

Lorsque la température décroit, l'intensité relative de l'une des séries de réflexions lamellaires augmente, cependant que l'intensité de la raie à $(4,2\ \mathring{A})^{-1}$ croit par rapport à l'intensité de la bande à $(4,5\ \mathring{A})^{-1}$. On pourra donc considérer que la première série de réflexions lamellaires correspond à une phase Lβ, et l'autre série à une phase Lα.

A température constante, les distances de répétition observées pour les deux phases sont indépendantes de la concentration en eau initiale du système. Lorsque la température décroit, la distance de répétition correspondant à la phase Lβ varie très peu, indiquant que cette phase ne peut incorporer qu'une faible quantité d'eau, de l'ordre de 8% au maximum ; lorsqu'on passe de 17°C à 0°C la distance de répétition de la phase Lα augmente considérablement, ceci pouvant correspondre à une hydratation maximum à 0°C de l'ordre de 42%. Lorsque la température continue à décroitre à partir de 0°C, une partie de l'eau se transforme en glace, cependant que la distance de répétition de la phase Lα décroit (voir fig. 19).

Cette démixtion parait donc analogue aux démixtions observées lors des changements d'état d'un mélange "non idéal" de deux composés (voir fig.20). A une température donnée, la variance du système est nulle, et on a en présence, en proportions variables, deux phases, Lα et Lβ, dont la composition

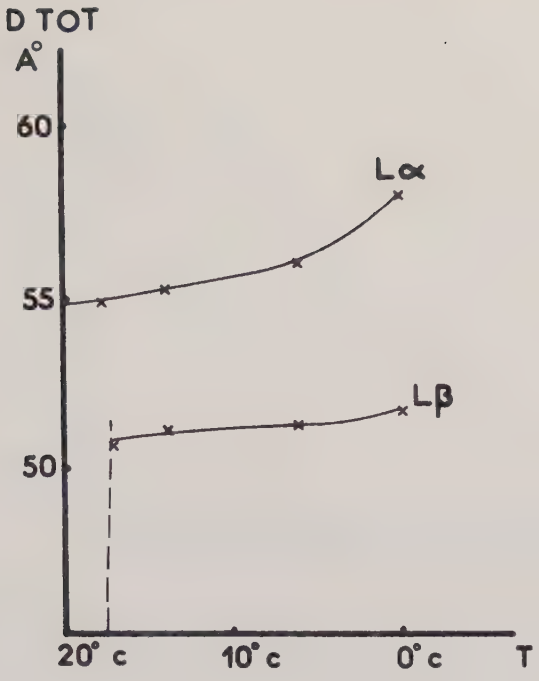


Fig.19 - Lecithine CIOCI8. Concentration en eau initiale du système: I7%.
Variation de la distance de répétition correspondant respectivement à la phase Lα et à la phase Lβ en fonction de la température.

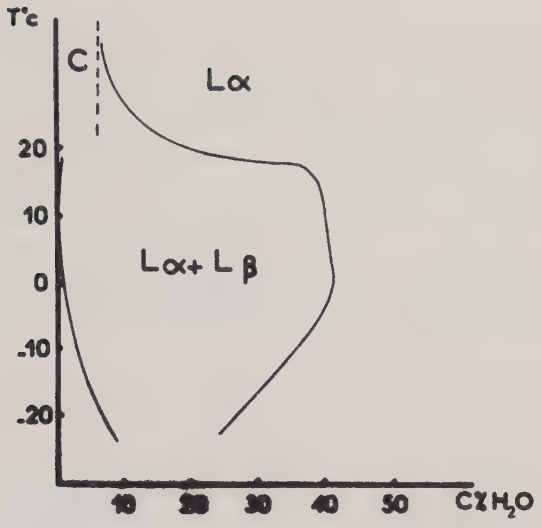
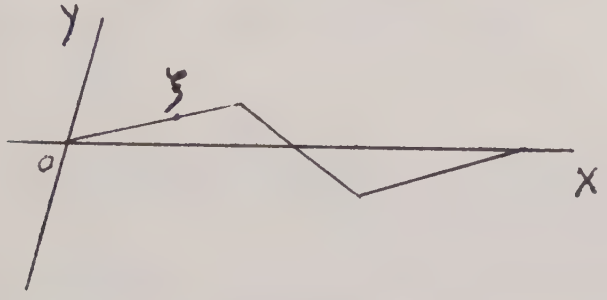


Fig.20 - Lecithine C10C18. Diagramme des phases. Il n'existe pas de région au dessous de la température Tc contenant de phase pure. La courbe représentée ici est analogue à une courbe de demixtion, à une température donnée, la concentration en eau des phases Lα et Lβ est indépendante de la concentration en eau initiale du système.

ne dépend que de la température, la proportion de chacune des phases, dépendant de la concentration en eau initiale du système. Le fait que l'on n'observe jamais la phase Lβ tout à fait pure, peut être dû simplement au fait que l'appareillage utilisé ne permet pas de descendre au dessous de -30°C. Le fait que l'on n'observe pas de phase de type Lβ' avec ce composé, confirme l'hypothèse que la phase Lβ' est liée à la localisation de tous les groupes CH_3 dans un même plan.

APPENDICE I

CALCUL DE L'AMPLITUDE DES ONDULATIONS.



Ce calcul suppose que l'axe OY est parallèle aux axes des chaînes paraffiniques. On ne peut dans ce calcul espérer obtenir plus qu'un ordre de grandeur, aussi cette approximation est tout à fait justifiée.

Le modèle utilisé est celui représenté dans la figure précédente.

On a donc $\rho(0,y) = \rho(x, y + \xi_x)$

La projection de $\rho(x\ y)$ sur OY sera donc égale à $\rho(0,y) * t(y)$ où $t(y)$ est la projection de la distribution des ξ.

Si l'amplitude de l'ondulation est 2a, $t(y)$ est donc une fonction égale à 1 pour $-a < y < +a$ et égale à zéro ailleurs.

$$I(0,k) = f^2(k) \cdot \tau^2(k) \qquad f = \mathcal{F}(\rho(y)) \qquad \tau = \mathcal{F}(t(y))$$

D'autre part la section de la fonction de Patterson

$$P(0,y) = \rho(0,y) * \rho(0,y)$$

D'où $\sum_h I(hk) = f^2(k)$

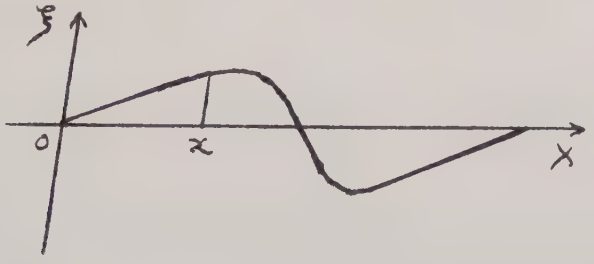
$$\frac{I(0k)}{\sum_h I(h,k)} = \tau^2(k) = \frac{\sin^2 2\pi a s_k}{(2\pi a s_k)^2}$$

Ce facteur s'annulant pour $(17\ \mathring{A})^{-1} < sk < (13\ \mathring{A})^{-1}$, 2a est très peu différent de 15 $\mathring{A}$.

APPENDICE II

CALCUL DES FACTEURS DE STRUCTURE.

Les densités électroniques sont définies par rapport à 2 axes, l'axe OX et un axe ξ parallèle à la direction des axes des chaînes.



Nous avons décomposé ξ en série de Fourier :

$$F(h,\xi^*) = A\int_0^1 \cos 2\pi\left(hx + \xi^* \sum_{j=1}^{\infty} \delta_j \sin 2\pi j x\right) dx$$

Si l'on suppose que les δ_j , $j > 1$ sont petits :

$$\cos 2\pi\left(hx + \xi^* \sum_{j=1}^{\infty} \delta_j \sin 2\pi j x\right) = \cos 2\pi\left(hx + \xi^* \delta_1 \sin 2\pi x\right)$$
$$- 2\pi \sin 2\pi\left(hx + \xi^* \delta_1 \sin 2\pi x\right) \xi^* \sum_{j=2}^{\infty} \delta_j \sin 2\pi j x =$$

Si $2\pi x = \theta$

$$= \cos\left(h\theta + 2\pi\xi^*\delta_1 \sin\theta\right) - \sin\left(h\theta + 2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right).2\pi\xi^* \sum_{j=2}^{\infty} \delta_j \sin j\theta$$

$$= \quad A \quad - \quad \Sigma B_j$$

$$B_j = \sin j\theta . 2\pi\xi^*\delta_j .\left[\sin h\theta . \cos\left(2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right) + \cos h\theta . \sin\left(2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right)\right]$$
$$= \pi\xi^*\delta_j \left\{\cos\left(2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right)\left[\cos(h-j)\theta - \cos(h+j)\theta\right] + \right.$$
$$\left. \sin\left(2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right)\left[\sin(h+j)\theta + \sin(j-h)\theta\right]\right\}$$

$$F(h,\xi^*) = \frac{K}{2\pi}\int_0^{2\pi}\left\{\cos\left(h\theta + 2\pi\xi^*\delta_1\sin\theta\right) - \sum_{j=2}^{\infty} B_j\right\} d\theta$$

$$= K\, J_h\left(2\pi\xi^*\delta_1\right) - \pi\xi^* \sum_{j=2}^{\infty} \delta_j \begin{cases} \left[J_{h+j}\left(2\pi\xi^*\delta_1\right) + J_{j-h}\left(2\pi\xi^*\delta_1\right)\right], h, j, \text{parités} \pm \\ \left[J_{j-h}\left(2\pi\xi^*\delta_1\right) - J_{h+j}\left(2\pi\xi^*\delta_1\right)\right] h, j, \text{parités} \mp \end{cases}$$

$$\Rightarrow \frac{F(h,\xi^*)}{K} = J_h(2\pi\xi^*\delta_1) - \pi\xi^* \sum_{j=2}^{\infty} \delta_j \left[J_{j-h}(2\pi\xi^*\delta_1) + (-1)^{(h+j+1)} J_{h+j}(2\pi\xi^*\delta_1) \right]$$

En négligeant les termes correctifs supérieurs à 2, on obtient :

$h = 0 \qquad F(0, \xi^*) = J_0(2\pi\xi^*\delta_1)$

$h = \pm 1 \qquad F(\pm 1, \xi^*) = J_1(2\pi\xi^*\delta_1)(\pm 1 \mp \pi\xi^*\delta_2)$

$h = \pm 2 \qquad F(\pm 2, \xi^*) = \pm J_2(2\pi\xi^*\delta_1) \mp \pi\xi^*\delta_2 [J_0(2\pi\xi^*\delta_1)]$

etc.

Les facteurs de structure, calculés avec $\delta_1 = 0{,}1$, $\delta_2 = -0{,}02$ et l'angle $(Oy, O\xi) \# 8°$ sont donnés dans le tableau

Le modèle représenté en Fig. 17 a été tracé avec ces valeurs.

CHAPITRE II : ETUDE DE LA REGION SECHE DU DIAGRAMME DE PHASES.

A - PHASE CRISTALLINE

Cette phase est observée avec la lécithine di C18 complètement sèche, et avec toutes les autres lécithines y compris la lécithine d'oeuf en présence de 2 à 3% d'eau. Cette phase correspond sans doute à celle observée par Chapman (1967) par cristallisation de la di C18 en solvant organique, et appelée "anhydrous crystals". Toujours d'après Chapman, la cristallisation en solvant organique des autres lécithines, mène à des structures différentes.

Le domaine d'existence de cette phase, en fonction de la température semble pour les composés synthétiques, être à peu près indépendant de la longueur de la chaîne paraffinique; la transition de phase a lieu vers 90°C. Dans le cas de la lécithine d'oeuf, cette transition a lieu vers 50°C.

A 20°C, lorsque la concentration en eau augmente, jusqu'à c = 6% environ on observe une démixtion entre la phase cristalline qui commence à se désorganiser, et une autre phase (qui peut être Lβ, Lβ', Pβ'...). Avec la lécithine d'oeuf, cette phase n'est en fait jamais observée tout à fait pure, mais le degré d'impureté reste toujours très faible.

Les clichés de diffraction présentent :

- une série de réflexions lamellaires fines aux petits angles.
- une série de réflexions fines extra lamellaires depuis $(10\ \mathring{A})^{-1}$ environ jusqu'à $(2\ \mathring{A})^{-1}$.
- deux ou trois réflexions particulièrement intenses entre $(4{,}4\ \mathring{A})^{-1}$ et $(4{,}1\ \mathring{A})^{-1}$. (voir Fig. 21).

L'indexation des réflexions observées est délicate et rarement dépourvue d'ambiguité dans une maille d'aussi grandes dimensions. Cependant, un type d'indexation s'avère particulièrement satisfaisant, en ce qu'il permet d'indexer les réflexions observées dans un réseau trirectangle primitif, dont les côtés a et b sont les mêmes pour toutes les lécithines étudiées.a et b sont égaux respectivement à 10,7 $\mathring{A}$, et 8,6$_5$ $\mathring{A}$. Le côté c est fonction de la longueur de la chaîne paraffinique du composé considéré. Encore une fois il faut remarquer le comportement particulier de la lécithine di C18, (observée complètement sèche), dont toutes les réflexions peuvent s'indexer dans un réseau trirectangle centré, de dimensions a, 2b, c. (voir table VII).

Fig.21- Cliché de diffraction des rayons X obtenu avec la lécithine didécanoyl. Phase Cristalline. Toutes les réflexions observées peuvent être indéxées dans une maille orthorhombique de dimensions a= 10.7Å, b=8.6 Å, c= 38.4Å.

TABLE VII - PHASE CRISTALLINE. DIMENSIONS DE LA MAILLE OBSERVEE AVEC LES DIFFERENTES LECITHINES.

di C10	di C12	di C14	C10 C18	di C18
a = 10,7 Å	a = 10,7 Å	a = 10,7 Å	a = 10,7 Å	a = 10,7 Å
b = 8,6 Å	b = $8,6_5$ Å	b = $8,6_5$ Å	b = $8,6_5$ Å	b = 17,3 Å
c = 38,4 Å	c = $43,0$ Å	c = 47,6 Å	c = 47,6 Å	c = 56,8 Å
S = 92 $Å^2$	S = 92,5 $Å^2$	S = 92,5 $Å^2$	S = 92,5 $Å^2$	S = 185 $Å^2$
$\bar{v}' = 0,91_1$	$\bar{v}' = 0,93_2$	$\bar{v}' = 0,95_0$	$\bar{v}' = 0,95_0$	$\bar{v}' = 1,00_0$

La surface ab doit correspondre à la surface d'un nombre entier de groupes polaires. ab = 92,5 $\mathring{A}^2$; si l'on considère que Σ = 20,4 $\mathring{A}^2$ est la surface minimale par chaîne paraffinique, (voir Lβ) et que la surface maximale pour une phase à chaînes rigides est S/ℓ = 27 $\mathring{A}^2$ (voir Lβ'), on obtient N = 4 molécules par maille, et S/ℓ = 23 $\mathring{A}^2$. Cette valeur permet de calculer le volume spécifique de chaque lécithine dans cette phase. On trouve que le volume spécifique d'une lécithine dans la phase cristalline est légèrement supérieur au volume spécifique d'une lécithine dans la phase Lβ. (voir tableVII). Le calcul est fait en supposant que la quantité d'eau présente dans la phase, correspond à l'existence d'un monohydrate pour toutes les lécithines (sauf pour la di C18).

Le groupe de symmétrie est déterminé en tenant compte du fait que la molécule de lécithine étant optiquement active, (et les composés utilisés étant tous des composés L et non DL), on ne peut avoir que des axes de symétrie.

La maille étant dans tous les cas primitive (sauf pour la lécithine di C18) et au moins trirectangle, nous avons d'abord postulé que la symétrie était la plus élevée possible, et que la maille était en fait à symétrie orthorhombique.

Les groupes de symétrie possibles sont alors : P222, $P2_122$, $P2_12_12$. Pour chacun de ces groupes il existe une molécule par unité assymétrique, pour aller plus loin, il est nécessaire d'examiner les positions permises par chacun de ces groupes de symétrie, et de chercher si ces positions sont compatibles avec ce que nous savons sur les molécules de lécithines et en particulier sur les modes d'organisation possible des chaînes.

Il est dès maintenant possible de tirer quelques conclusions quant à l'organisation des chaînes :

- Le fait que la lécithine d'oeuf dont les chaînes sont hétérogènes en longueur et degré de saturation présente une phase cristalline, indique que dans cette phase seule la direction des axes des chaînes est strictement déterminée, et que les chaînes peuvent présenter un certain désordre rotationnel.

- L'existence de raies fortes autour de $(4,2\ \mathring{A})^{-1}$ montre par analogie avec la phase Lβ que les chaînes sont étirées, et que la surface par chaîne dans un plan perpendiculaire à son axe, est voisine de 20,4 $\mathring{A}^2$.

- Le fait que la lécithine C10 C18 se comporte de la même façon que

la lécithine diC14 permet de déduire que dans la lécithine C10 C18 les chaînes sont imbriquées (voir Fig 22) et par extension, on admettra que dans tous les cas, à toute chaîne du 1/2 feuillet supérieur correspond une chaîne du 1/2 feuillet inférieur, vraisemblablement située dans son prolongement.

- L'identité de la surface ab de la maille, permet de conclure que l'angle fait par l'axe des chaînes avec la perpendiculaire au plan du feuillet est le même, ou presque le même quelle que soit la lécithine considérée.

La détermination de l'angle de l'axe d'une chaîne avec la perpendiculaire au plan du feuillet, en admettant cet angle constant, peut se faire de deux façons :

- Par l'étude de la variation de l'épaisseur du feuillet lipidique en fonction de la longueur de la chaîne. Cette détermination est certainement la plus précise. La variation moyenne d'épaisseur lorsqu'on passe d'un composé en C2n au composé en C2n + 2 étant de 4,6 Å, l'angle ainsi déterminé est de 23° (voir Fig. 23).

- Par la comparaison de l'épaisseur mesurée du feuillet et de la longueur d'une molécule de lécithine étirée, qui est connue par ailleurs. L'angle ainsi déterminé varie de 23° à 26°. Cette incertitude est due à l'incertitude sur la composition en eau et le volume spécifique. (Rappelons que les "longueurs" ainsi calculées sont toujours des longueurs fictives, la tête polaire étant supposée non hydratée, et étant supposée occuper une surface égale à 2 fois la surface par chaîne paraffinique).

Pour des raisons d'encombrement les chaînes ne peuvent qu'être situées dans des plans parallèles qu'on supposera équidistants. Comme dans un feuillet, à une chaîne du 1/2 feuillet supérieur correspond une chaîne du 1/2 feuillet inférieur de direction parallèle, toutes les chaînes d'un même plan seront parallèles entre elles. On les supposera également équidistantes. D'autre part, l'angle de l'axe des chaînes avec la normale au plan du feuillet étant non nul et la maille orthorhombique, les chaînes paraffiniques pourront prendre deux directions symétriques par rapport à la normale au plan du feuillet. Ceci est compatible avec $P2_122$ et P222, si les plans contenant les chaînes sont parallèles à l'un des côtés de la maille et pour des raisons d'encombrement, parallèles, au plus grand côté. Les plans contenant les chaînes seront donc les plans $y = 1/4$, $y = 3/4$.

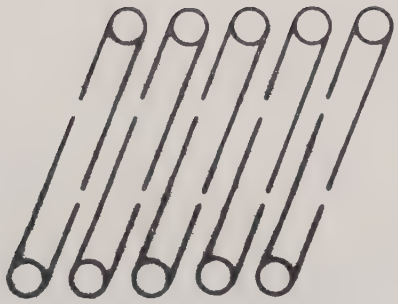


Fig. 22 - Lécithine C10C18. Organisation des chaînes paraffiniques dans la phase cristalline.

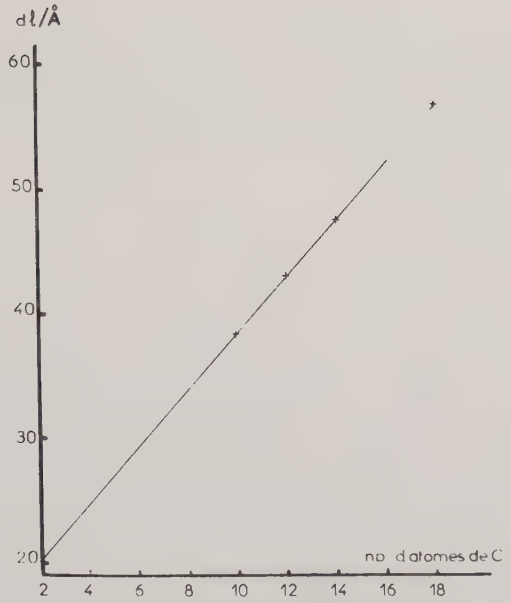


Fig.23- Variation en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaine paraffinique de la distance de répétition lamellaire dans la phase cristalline. Ce graphique permet de déterminer l'angle d'inclinaison des axes des chaines paraffiniques par rapport à la normale au plan des lamelles. L'angle trouvé est de 23°.

En fait, la raie 100 étant systématiquement absente, nous ne considérerons dans la suite que le groupe de symmétrie $P2_122$. Il existe un modèle simple qui attribue la même direction aux deux chaînes d'une même molécule, ce qui revient à dire que les têtes polaires seront situées dans des plans proches des plans $y = 1/4$, $y = 3/4$. Il est donc suffisant de considérer la position des molécules dans un de ces plans ; si dans un de ces plans, l'angle fait par l'axe des chaînes avec la normale au plan du feuillet est de $+\theta$ il est de $-\theta$ dans le plan suivant. Ce modèle est représenté en Fig. 24 il existe en fait deux cas possibles, suivant que l'axe des chaînes passe ou ne passe pas par un axe 2 parallèle à Oy (voir Fig. 25). Dans le modèle 1, sont dans le prolongement l'une de l'autre deux chaînes paraffiniques ayant des positions différentes par rapport à la tête polaire, ce modèle est donc valable pour les lécithines possèdant deux chaînes paraffiniques de longueur différentes, (lécithine C10 C18), dans le modèle 11 sont dans le prolongement l'une de l'autre deux chaînes paraffiniques occupant la même position par rapport à la tête polaire, et ce modèle n'est donc valable que pour des lécithines possèdant deux chaînes paraffiniques de longueur identique.

Les corrélations entre lamelles sont sans doute assurées par l'enchevètrement des têtes polaires, et nous dirons que cet enchevètrement est tel que si x_o est la trace d'une tête polaire dans le plan $z = 1/2$, la trace d'une tête polaire du feuillet suivant toujours dans le plan $z = 1/2$ doit être $x_o + 1/2$. (ce type d'organisation des têtes polaires est observé dans les savons cristallins). Dans les deux cas de figure considérés, si nous supposons la tête polaire dans le prolongement d'une chaîne paraffinique, cette condition est réalisée. Pour

modèle n° 1 (voir Fig.25) $c/a\ tg\theta = n$

modèle n° 11 (voir Fig.25) $c/a\ tg\theta = n' + 1/2$

Nous avons calculé les valeurs de n et n' qui donnent pour chaque lécithine la valeur de θ la plus proche de 23°.

di C10	c/a tg θ	= 1,5	tgθ	= 0,418	θ = 22°,45	modèle 11
di C12	"	2,0	"	0,500	" 26°,30	modèle 1
di C14	"	2,0	"	0,445	" 24°	modèle 1
di C18	"	2,5	"	0,470	" 25°,10	modèle 11

En fait on voit qu'il est impossible de concilier les hypothèses suivantes :

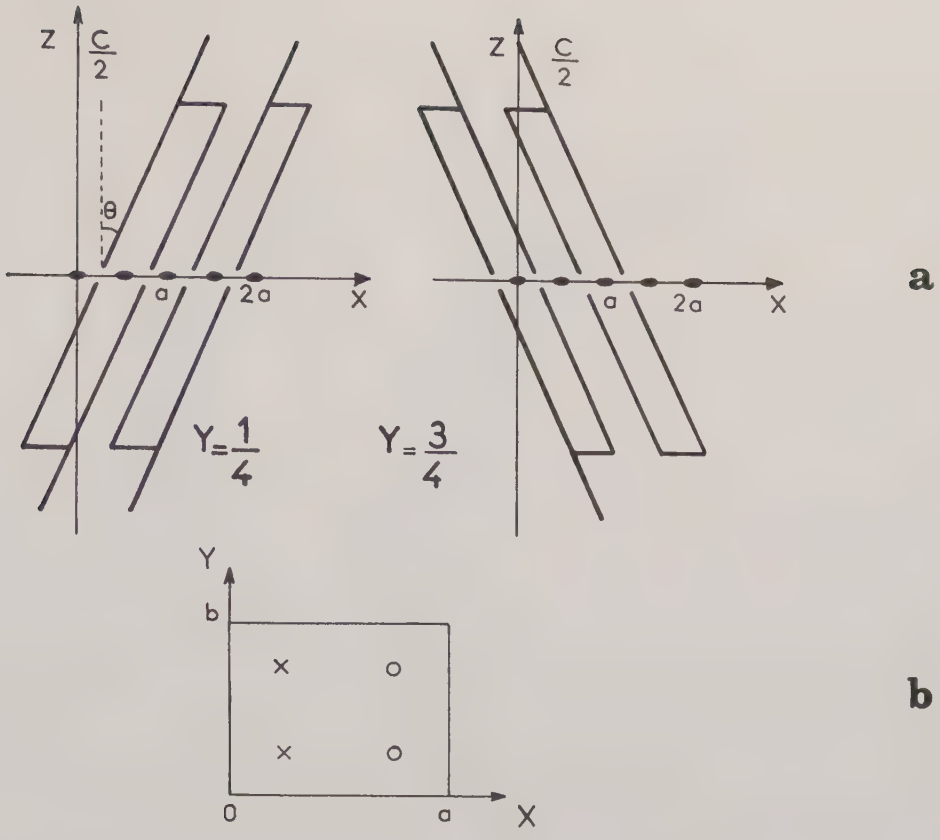


Fig.24-Représentation schématique de la structure de la phase cristalline. Groupe de symétrie P_{2_I22}. a) Les molécules sont localisées dans les plans y= I/4, y= 3/4. Les positions des molécules sont x,y,z $\bar{x}$,y,$\bar{z}$ I/2+x, $\bar{y}$,$\bar{z}$, I/2-x,$\bar{y}$,z. ▬ Position des axes d'ordre 2 perpendiculaires à Ox. b) Dans le plan xOy, X Position des têtes polaires dans le plan z= I/2, o Position des têtes polaires dans le plan z= -I/2, dans le cas ou C/A tg θ = 2.

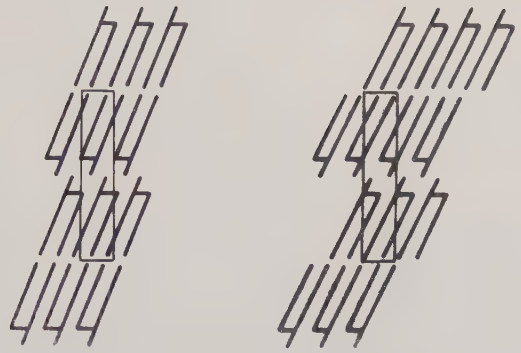


Fig. 25-Modèles proposés pour l'organisation des molécules dans des plans y= cte. Dans le modèle I, les chaines paraffiniques ne passent pas par un axe de symétrie d'ordre deux. Les lécithines possédant deux chaines paraffiniques de longueur différente pourront cristalliser dans ce système. (lec. CIOCI8) . Dans le modèle II, les chaines paraffiniques passent par des axes de symétrie d'ordre deux, et seules des molécules possédant deux chaines paraffiniques de longueur identique pourront cristalliser dans ce système.

a) - un angle d'inclinaison des chaînes indépendant de leur longueur.

b) - une maille orthorhombique (ou simplement trirectangle).

c) - l'organisation des têtes polaires postulée plus haut.

d) - les chaînes paraffiniques de 1/2 feuillet inférieur dans le prolongement des chaînes du 1/2 feuillet supérieur.

L'une d'elles au moins doit être abandonnée.

Il est possible en effet (abandon de l'hypothèse a) que l'angle varie légèrement d'un composé à un autre, l'arrangement des têtes polaires et des chaînes restant identiques. Les variations de l'angle θ attendues dans ce cas étant faibles, $\pm$ - 2°, peuvent ne pas avoir été décelées.

Il est également possible que cet angle reste vraiment constant et de l'ordre de 23°, on pourra alors conserver une maille orthorhombique s'il existe une certaine latitude de mouvement au niveau des têtes polaires, ou plus simplement en abandonnant l'hypothèse d. Par exemple, dans le cas de la di C12 qui présente l'écart le plus grand avec l'angle déterminé par d'autres méthodes, il suffit d'un déplacement des têtes polaires ou des chaînes de 1,2 Å pour conserver un angle de 24°.

La lécithine C10 C18 s'intègre parfaitement dans ce schéma, car pour la longueur moyenne C14, il n'est pas besoin de postuler de déplacement des chaînes. Il serait à cet égard intéressant d'étudier le comportement d'une lécithine ayant deux chaînes de longueur différente, mais dont la longueur moyenne correspondrait à une chaîne en C10 ou C12.

La lécithine d'oeuf donne également une phase cristalline. L'angle de l'axe des chaînes par rapport aux lamelles est difficile à déterminer car on ne connait pas exactement la composition de la phase (elle n'est pas observée tout à fait pure). Il doit y avoir comme dans la lécithine C10 C18 un certain enchevêtrement des chaînes, la longueur moyenne d'une chaîne étant sensiblement égale à C17, l'angle θ devrait être un peu inférieur à 23°.

Dans la mesure où dans la lécithine d'oeuf la chaîne la plus longue a toujours la même position par rapport à la tête polaire, cette structure ne peut correspondre qu'au cas n° 1 (voir plus haut).

Nous avons tenté de vérifier ce modèle cristallographiquement.

La répartition des intensités des réflexions lamellaires, pour tous les composés en di C2n, est celle attendue pour un feuillet lipidique dont

tous les groupes CH3 sont localisés au centre. A cet égard il est intéressant de noter que les intensités des réflexions lamellaires sont très différentes pour la lécithine di C14 et la lécithine C10 C18. Dans ce dernier cas, les groupes CH3 sont localisés de part et d'autre du centre du feuillet.

Ces deux composés (C10 C18 et di C14) sont en fait analogues aux dérivés isomorphes obtenus, avec les protéines, par fixation d'atomes lourds. Comme tels, ils pourraient fort bien être utilisés pour la détermination des phases des réflexions observées.

En ce qui concerne les réflexions extra lamellaires, les positions particulières des chaînes font que la maille des chaînes paraffiniques est la moitié de la maille, et que le facteur de structure des chaînes est nul pour les raies 10ℓ , 01ℓ , et 11ℓ . Les intensités des raies de ces séries dépendront donc uniquement de la position des têtes polaires, et particulièrement de la position des groupes phosphates. Nous n'avons pas cherché à préciser davantage ces positions. Rappelons que dans le cas particulier de la lécithine di C18, l'arrangement des têtes polaires est centré).

La contribution des chaînes paraffiniques aux raies 20ℓ , 21ℓ , et 02ℓ , est calculée en supposant que la matière est distribuée de façon homogène le long de leurs axes. Les facteurs de structure sont alors de la forme (voir tables internationales)

$$F_{20\ell} = A \int_{\text{feuillet}} \left[-\cos 2\pi z \left(\ell + \frac{2c}{a} \operatorname{tg}\theta\right) - \cos 2\pi z \left(\ell - \frac{2c}{a} \operatorname{tg}\theta\right) \right] dz$$

$$F_{21\ell} = A \int_{\text{feuillet}} \left[-\cos 2\pi z \left(\ell + \frac{2c}{a} \operatorname{tg}\theta\right) + \cos 2\pi z \left(\ell - \frac{2c}{a} \operatorname{tg}\theta\right) \right] dz .$$

$$F_{02\ell} = -2A \int_{\text{feuillet}} \cos 2\pi \ell z \, dz .$$

Pour plus de simplicité, nous nous sommes placés dans le cas où toutes les hypothèses a, b, c, d, sont vérifiées. Ceci est vrai au moins pour la lécithine di C14, où $c/a \operatorname{tg}\theta = 2$. Les raies fortes des rangées 20ℓ et 21ℓ seront donc celles pour lesquelles, $\ell = 3,4,5$. Dans la rangée 02ℓ la raie la plus intense correspond à $\ell = 0$.

Les raies observées les plus intenses, correspondent effectivement aux indices 204, 205, 213, 214, 215, et 020. Ce qui est en parfait accord avec le simple calcul fait précédemment.

Pour pouvoir aller plus loin il faudrait rechercher la localisation précise des têtes polaires.

Nous nous sommes volontairement arrêtés à cette vérification cristallographique sommaire, car nous ne disposions que de diagrammes de poudre, et dans ce cas particulier les dimensions de la maille font qu'un grand nombre de réflexions sont multiples. Aussi vouloir aller plus loin nous semblait illusoire.

Il faut enfin remarquer qu'on obtiendrait sans doute un accord aussi bon, sans postuler la symétrie orthorhombique, avec une maille trirectangulaire dans laquelle tous les axes des chaînes seraient parallèles. Néanmoins, nous n'avons pas retenu cette hypothèse car il est alors difficile de comprendre que la maille ne soit pas dans quelques cas du moins oblique.

B - PHASE Lδ (déjà citée dans le tiré à part "Polymorphism of lecithins")

L'obtention de cette phase est délicate, elle nécessite des lécithines complètement sèches, et lorsqu'on opère en élevant la température, la phase semble n'être stable que dans un domaine de température très restreint, I ou 2°C. Lorsque l'on part de la phase pδ et que l'on abaisse la température, on peut obtenir la phase Lδ à l'état métastable pendant quelques jours. En fait cette phase n'a été observée tout à fait pure, qu'avec la lécithine d'oeuf contenant 6% de CTAB, et avec la lécithine di C12. Généralement on observe une démixtion entre une phase Lδ et une phase Lβ.

Cette phase est lamellaire comme l'indiquent les réflexions observées aux petits angles. Le nombre de ces réflexions n'excède jamais 4, et la 2ème et la 3ème réflexion sont toujours d'intensité très faible. La situation est plus complexe aux grands angles où l'on observe à la fois des raies et des bandes (voir Fig. 26 et 27).

On observe une bande vers $s_o = (6{,}8\ \mathring{A})^{-1}$, la superposition d'une raie et d'une bande toutes deux très intenses à $s_1 = \sqrt{2}\ s_o$, et toutes deux faibles à $s_2 = 2s_o$, et enfin une seconde bande à $s_3 = \sqrt{5}\ s_o$. La position des bandes indiquée ici correspond au bord interne de la bande.

Les raies observées sont compatibles avec une organisation latérale des paraffines selon un réseau quadratique bidimensionnel, le côté de la maille étant égal à 4,8 $\mathring{A}$.

La forme des bandes observées est identique à la forme d'une bande calculée pour un réseau de points bidimensionnels, dans le cas d'un diagramme de poudre (Guinier, 1956).

Les bandes observées seront donc considérées comme étant caractéristiques d'une organisation des têtes polaires également à symétrie quadratique, le côté de la maille étant égal à 6,8 $\mathring{A}$. La bande la plus intense est observée autour de $(4{,}8\ \mathring{A})^{-1}$, ceci peut s'expliquer si, comme dans le cas de la phase cristalline, nous postulons que les têtes polaires de deux feuillets consécutifs sont encastrés. Dans ce cas la configuration la plus probable, est que les têtes polaires de 2 feuillets adjacents sont décalés de $a/\sqrt{2}$ dans le sens d'une diagonale (voir fig. 28). Dans ce cas, à chaque interface,

Fig.26- Cliché de diffraction des rayons X de la phase L$\mathcal{J}$, observée avec la lecithine d'oeuf complétement sèche à 42°C. Les raies fines centrales sont les ordres successifs relatifs à l'espacement 47 Å. Noter la bande à $s = (6.8\ Å)^{-I}$, la raie intense suivie d'une bande à $s = (4.8\ Å)^{-I}$, et la raie plus faible à $s = (3.4\ Å)^{-I}$. Les raies sont caractéristiques d'une organisation à symétrie quadratique des chaines paraffiniques, et les bandes d'une organisation également à symétrie quadratique des têtes polaires.

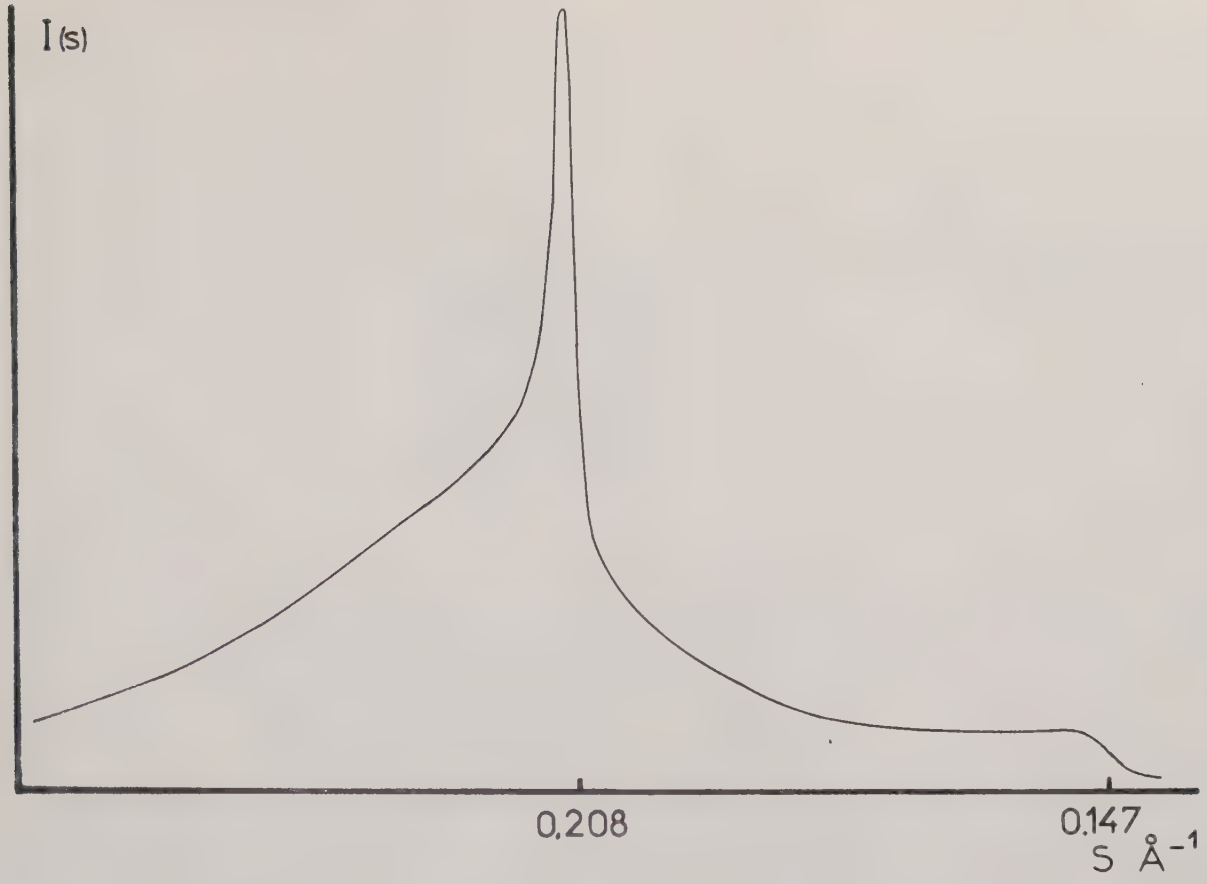


Fig. 27- Densitométrie dans la région des grands angles, du cliché de diffraction des rayons X de la phase Lδ. Il faut noter la faible intensité de la bande à $s = (6.8\ \mathring{A})^{-I}$ comparée à la bande à $s = (4.8\ \mathring{A})^{-I}$.

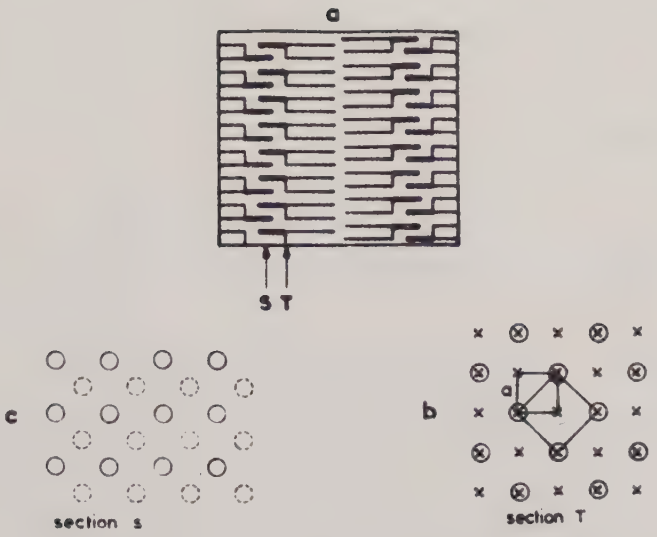


Fig.28- Représentation schématique de la phase L$\mathcal{S}$.

a) Section perpendiculaire aux lamelles. Les têtes polaires ont été représentées par des batons, pour bien monter qu'elles sont enchevêtrées.

b) Section T parallèle aux lamelles à l'interface partie polaire partie paraffinique. X: trace des chaines dans le plan de section. O: trace des têtes polaires dans le plan de section. Le côté de la maille correspondant aux chaines paraffiniques est $a = 4.8$ Å, le côté de la maille correspondant aux têtes polaires est $a\sqrt{2} = 6.8$ Å.

c) Section S parallèle aux lamelles. O trace des têtes polaires du demi-feuillet inférieur dans le plan de section. ⊗ trace des têtes polaires du demi feuillet supérieur dans le plan de section. Dans cette section, le réseau des têtes polaires est tétragonal centré. Cette organisation des têtes polaires permet de rendre compte de l'intensité des bandes observées dans la région des grands angles.

il existera un plan de section dans lequel le réseau des têtes polaires sera centré. Si l'encastrement des têtes polaires est tel que ce plan de section soit situé non loin des groupes phosphates, qui sont responsables de la plus grande partie de l'intensité diffusée par les groupes polaires, la 1ère bande à $(6,8\ \mathring{A})^{-1}$ pourra alors être très faible, et la bande à $(4,8\ \mathring{A})^{-1}$ sera très intense, ce qui est effectivement observé.

Le côté de la maille correspondant aux têtes polaires est égal à $\sqrt{2}$ fois le côté de la maille correspondant aux chaînes. Ceci indique que les axes des chaînes sont perpendiculaires au plan de la lamelle, donc $S/2 = \Sigma = 23\ \mathring{A}^2$.

Connaissant S, on peut calculer le volume spécifique de chaque lécithine dans cette phase. Les valeurs trouvées sont identiques à celles des lécithines dans la phase Lβ.

Nous avons donc établi :

- que les axes des chaînes paraffiniques sont perpendiculaires au plan du feuillet
- que les têtes polaires de deux feuillets adjacents ont une organisation rigide et sont enchevêtrées.

Il peut alors paraitre étonnant que l'on ne décèle aux rayons X aucun indice de corrélations entre lamelles. En fait ceci peut s'expliquer de la façon suivante :

Dans la lécithine d'oeuf, à cause de l'hétérogénéité des chaînes il peut exister une mince couche à structure désordonnée au centre du feuillet ce qui expliquerait la perte des corrélations ; dans la lécithine di CI2, cette hypothèse est exclue. Il est donc possible que dans cette phase, le demi feuillet inférieur et le demi feuillet supérieur aient la possibilité de glisser l'un par rapport à l'autre. Il existe aussi une autre interprétation, même si deux chaînes, appartenant l'une au demi feuillet supérieur et l'autre au demi feuillet inférieur sont situées dans le prolongement l'une de l'autre et sont cohérentes entre elles, les têtes polaires peuvent prendre une configuration A dans un demi feuillet et une configuration B dans le demi feuillet suivant, (voir fig. 29), ce qui peut suffire à expliquer la perte des corrélations.

Dans toutes les phases à chaînes rigides rencontrées jusqu'à présent, les chaînes sont "étirées", c'est à dire que deux groupes CH2 consécu-

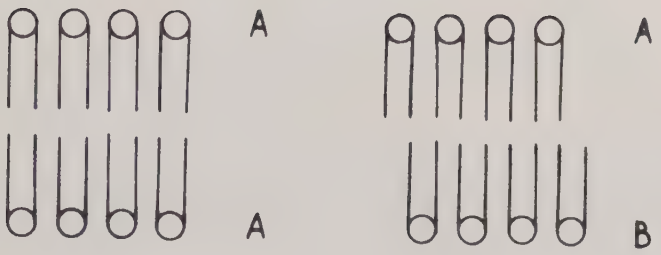


Fig. 29 - Modèle de disposition des molécules dans la phase Lδ permettant d'expliquer la perte des corrélations entre lamelles.

tifs se trouvent en position trans. Ce ne peut être le cas ici, car l'épaisseur du feuillet lipidique seraitalors beaucoup plus grande : 46,6 Å, contre 41 Å (observé) pour la di CI2. Nous avons donc cherché s'il existait des configurations stables des chaînes, permettant de rendre compte de l'épaisseur observée du feuillet lipidique.

De Santis and al, (1963) ont calculé l'énergie potentielle du polyéthylène à conformation hélicoïdale, en fonction des angles de rotation autour des liaisons de la chaîne principale. Ce calcul a été fait pour une chaîne isolée, en tenant compte des intéractions entre atomes non directement liés, jusqu'au 5ème voisin.

La conformation la plus stable correspond à $\Psi = 180°$; c'est à dire à la configuration trans. Il existe deux minima relatifs d'énergie potentielle, à $\Psi = 90°$, et $\Psi = 270°$ et deux autres à $\Psi = 60°$ et $\Psi = 300°$. Ces minima sont symétriques et correspondent à des enroulements en hélice des chaînes. La valeur de la projection sur l'axe de l'hélice d'un résidu CH2 est donnée par la formule :

$$z = \left[l^2 (1 - \cos\psi)(1 - \cos\theta) / (3 + \cos\theta - \cos\psi + \cos\psi\cos\theta) \right]^{1/2}$$

l est la distance C-C

θ l'angle de liaison

Ψ l'angle de rotation autour de la liaison C-C, mesuré à partir de la conformation cis.

Pour $\Psi = 60°$, z = 0,89 Å ; pour $\Psi = 90°$, z = 1,09 Å.

Dans un feuillet lipidique non hydraté, avec S = 46 $Å^2$, l'épaisseur due aux têtes polaires et aux groupes CH3 peut être évaluée à 19 Å. (20 Å dans la phase cristalline contenant 3% d'eau, avec S = 46 $Å^2$). Pour la lécithine di CI2 l'épaisseur calculée est alors :

pour $\Psi = 60°$ d = 17,8 + 19 = 36, 8 Å

" $\Psi = 90°$ 21,8 + 19 = 40,8 Å

l'épaisseur mesurée étant de 41,1 Å, $\Psi = 90°$ semble la valeur la plus probable. Cette valeur correspond à une hélice ayant 3,4 résidus par tour(Fig.30).

Pour la lécithine d'oeuf, nous avons considéré que la molécule moyenne était en C16 $C18_{:1}$. La contribution d'un groupe CH est difficile à évaluer. Les volumes occupés par les groupes CH et CH2 étant respectivement de 20 et 27 $Å^3$ dans la phase Lα, nous avons dit que le rapport des volumes était conservé dans la phase Lδ .

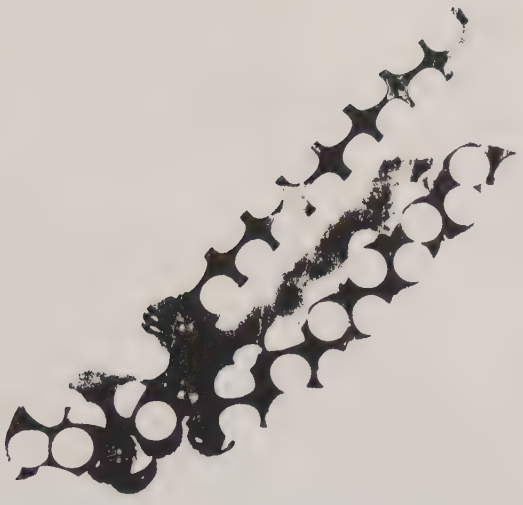


Fig.30 - Représentation d'une lécithine diC18.

Dans l'une des chaines de la molécule, les groupes CH2 consécutifs sont en position trans, alors que l'autre chaine est enroulée en hélice, l'angle entre entre groupes CH2 consécutifs étant égal à 90°. Il faut remarquer la diminution de longueur de la chaine paraffinique introduite par cet enroulement en hélice.

L'épaisseur théorique est alors :

pour $\Psi = 60°$ d = 0,89 x 26 + 4 x 0,67 + 19 = 44,6

" 90° d = 10,9 x 26 + 4 x 0,83 + 19 = 50,6

La valeur observée est de 47,2 Å. Le choix entre les deux valeurs de Ψ est donc ici difficile. La différence peut peut-être s'expliquer par la présence de doubles liaisons dont la contribution est difficile à évaluer. Nous accorderons donc plus de poids aux données obtenues avec le composé synthétique (di C12) et nous dirons que vraisemblablement dans cette phase $\Psi = 90°$.

C - PHASE Pδ

La phase Pδ est observée avec la lécithine d'oeuf et avec les lécithines synthétiques di C12 di C14 di C16, complètement sèches, entre 95°C et 160°C environ. Les données relatives à la lécithine d'oeuf et à la lécithine di C16, ont déjà été présentées dans le tiré à part "polymorphism of lecithins". Nous allons reprendre et détailler la description qui avait été donnée alors de cette phase.

Les diagrammes de diffraction des rayons X présentent une série de réflexions fines aux petits angles, qui peuvent toutes être indexées dans un réseau bidimensionnel rectangulaire centré : Cmm. L'organisation de la plus grande partie des têtes polaires et des chaînes paraffiniques est la même que dans la phase Lδ , comme en témoigne la présence aux grands angles de la bande à $s_o = (6,8\ \text{Å})^{-1}$ suivie de deux raies-bandes, intenses à $s_1 = \sqrt{2}\ s_o$ et faibles à $s_2 = 2s_o$. (voir Table VIII).

Le côté b de la maille est peu différent de l'épaisseur du feuillet lipidique dans la phase Lδ qui précède. Le côté a décroit avec la température, mais semble indépendant de la longueur de la chaîne paraffinique. (Tab.VIII). Il existe un modèle de structure en accord avec ces données : les têtes polaires sont organisées en rubans infiniment longs, ces rubans étant organisés dans un réseau bidimensionnel centré. Les chaînes paraffiniques partiellement ordonnées comme dans la phase Lδ et partiellement désordonnées, remplissent l'espace entre les rubans (voir fig. 31).

La variation, en fonction de la température, du paramètre b de la

TABLE VIII - PHASE Pδ.

	118°C	129°C	140°C
Lec di C14	a = 126 Å b = 42,3 Å	a = 116,5 Å b = 41,4 Å	a = 108 Å b = 39,7 Å

	114°C	121°C	136°C
Lec di C12	a = 115 Å b = 38,5 Å	a = 116,5 Å b = 38,5 Å	a = 108,5 Å b = 38,5 Å

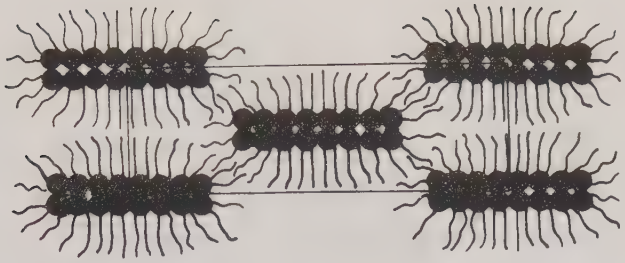


Fig. 31- Représentation schématique de la structure de la phase à ruban P_{δ}. La maille est rectangulaire centrée. Une partie des chaînes paraffiniques a la même configuration ordonnée que dans la phase L_{δ}, une autre partie est en configuration "liquide" pour remplir l'espace entre les rubans. D'autre part les chaînes paraffiniques "rigides" sont supposées devenir "liquides" en bout de chaîne afin de rendre compte de la variation du paramètre de la maille en fonction de la température.

maille correspondant à l'épaisseur lamellaire, est assez curieuse (voir table VIII). D'ordinaire, la distance de répétition, dans les phases à chaînes rigides est pratiquement indépendante de la température. Cette variation ne peut s'expliquer par une déformation du réseau des paraffines, car la position de la raie à $(4,8\ \mathring{A})^{-1}$ ne varie absolument pas lorsque la température s'élève. On est donc obligé de postuler l'existence de "désordre" ; il est peu probable que ce "désordre" corresponde à une désorganisation des têtes polaires, car si l'intensité de la bande à $(6,8\ \mathring{A})^{-1}$ décroit en fonction de la température, cette bande demeure néanmoins toujours visible. Il semble donc que ce soient les extrémités des chaînes qui tendent à prendre une conformation "liquide", lorsque la température s'élève.

On peut donner, pour l'existence de cette phase, une interprétation analogue à celle donnée pour l'existence de phases à rubans dans les savons (Skoulios et Luzzati, 1961), et qui rend compte de la variation observée des paramètres de la maille en fonction de la température. La transition de phase $L\delta$, $P\delta$, peut s'expliquer par un "conflit" entre un arrangement cristallin des têtes polaires et une tendance au désordre des chaînes paraffiniques lorsque la température s'élève. Les têtes polaires conservant une organisation cristalline (bande à $6,8\ \mathring{A}^{-1}$), les chaînes, ancrées aux têtes polaires, auront une mobilité pratiquement nulle près de celles-ci ; mais la mobilité pourra croitre le long de la chaîne. Ainsi les chaînes pourront rester ordonnées dans un réseau quadratique près des têtes polaires, et devenir presque "liquides" en bout de chaîne. La formation de "rubans", et la diminution des paramètres de la maille lorsque la température s'élève, est ainsi expliquée.

Le nombre des réflexions observées permettant une vérification cristallographique (entre 6 à 10 ref. environ), nous avons avec ce modèle, calculé les facteurs de structure dans le cas de la lec. di CI2 à 121°. La densité électronique des groupes CH2 des chaînes a été considérée comme constante et prise comme niveau de référence. Dans ces conditions les éléments de structure sont 2 fentes, l'une constituée par les groupes polaires, de largeur $2R_I = 14\ \mathring{A}$, avec $\rho_{POL} - \rho_{CH2} = 0,175$, l'autre constituée par les groupes CH3 de largeur $2R_2 = 4\ A$, avec $\rho_{CH2} - \rho_{CH3} = 0,137$.

TABLE IX - PHASE Pδ . COMPARAISON DES FACTEURS DE STRUCTURE OBSERVES ET CALCULES.

hk	Fobs	Fcalc	
00		+ 950	
20	126	+ 117	
11	370	+ 550	
40	66	- 75	
31	110	- 120	
51	29	+ 30	
60	30	+ 34	43
02		+ 26	
22	17	+ 3	
42	11	- 2	
71	8	- 2	

Ces données sont obtenues avec la lécithine dilauryl complètement sèche à 121°C.

L'expression de F est alors :

$$F = \frac{\sin \pi l s_h}{2\pi s_h} \left[(\rho_{tot} - \rho_{CH_2}) \frac{\sin 2\pi R_1 s_k}{2\pi s_k} + (-1)^k (\rho_{CH_2} - \rho_{CH_3}) \frac{\sin 2\pi R_2 s_k}{2\pi s_k} \right] e^{-\frac{\alpha_1}{2} s_h^2 - \frac{\alpha_2}{2} s_k^2}$$

Les seuls paramètres variables sont la longueur l du ruban, et les valeurs α_1 et α_2 intervenant dans les gaussiennes.

L'accord entre les intensités observées et calculées est très bon pour l = 51, α_1 = 830, α_2 = 1330. (Table IX).

En fait ce modèle est simplifié car il ne tient pas compte des zones de désordre aux extrémités des rubans, qui peuvent avoir des densités électroniques inférieures à ρ_{CH2}.

Avec cette valeur de l, la surface calculée par tête polaire dans cette phase, est identique à la surface par tête polaire dans la phase Lδ .

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Au cours de cette étude de diverses lécithines à "chaînes rigides", nous avons décrit la structure d'un certain nombre de phases nouvelles. Comme nous l'avions fait pour les phases à chaînes "liquides", nous pouvons résumer les résultats les plus marquants, et tenter à partir de ceux ci et des résultats déjà connus, d'établir des corrélations entre composition chimique et structure.

De même que pour les phases à chaînes "liquides", nous pouvons ici distinguer deux régions du diagramme de phases :

Dans la région sèche, les résultats obtenus confirment que la succession des phases observées ne dépend que de la nature des têtes polaires. Nous avons déterminé la structure de trois nouvelles phases, qui présentent chacune, des caractéristiques intéressantes. L'observation d'une phase tridimensionnelle (phase "cristalline") avec la lécithine d'oeuf dont la composition en chaînes est hétérogène, indique que les lipides peuvent donner des phases tridimensionnelles dans lesquelles seule la direction de l'axe des chaînes paraffiniques est strictement définie, et donc dans lesquelles les chaînes sont susceptibles de présenter un certain désordre rotationnel.

Nous avons également mis en évidence (L δ) une nouvelle conformation des chaînes paraffiniques, une conformation hélicoïdale des chaînes organisées dans un réseau quadratique. Cette conformation, théoriquement possible et décrite depuis longtemps, n'avait jamais été mise en évidence dans des systèmes lipidiques, pas plus qu'une organisation des chaînes à symétrie quadratique. Nous avons également pour la première fois observé une phase dans laquelle il existe une organisation strictement périodique à deux dimensions des têtes polaires, et aucun indice, par rayons X, de corrélations entre lamelles.

Et c'est encore la première fois que l'on observe dans une phase, avec un composé homogène, qu'une partie des chaînes conserve une configuration ordonnée, tandis qu'une autre partie est dans un état "liquide", (cas de la phase à rubans P δ). La formation des phases à "rubans" connues jusqu'alors, (savons) s'accompagnait toujours d'une fusion totale des chaînes paraffiniques.

Dans la région hydratée du diagramme de phases, les études précédentes faites sur les savons, ainsi que des études faites récemment au laboratoire (par L. Mateu) sur différentes espèces lipidiques, tendent à montrer qu'il existe un polymorphisme particulier à chaque espèce lipidique. Mais dans cette région du diagramme de phases, la composition en chaînes paraffiniques joue également un rôle prépondérant, que l'étude comparative de la lécithine d'oeuf et des lécithines synthétiques nous a permis de mettre en évidence. C'est ainsi que suivant la composition en chaînes paraffiniques nous avons pu distinguer quatre cas ; les phases observées dans chacun de ces cas diffèrent par le degré d'ordre au niveau des chaînes paraffiniques, par l'angle de l'axe des chaînes ordonnées par rapport au plan des lamelles, et par la forme des éléments de structure qui peuvent être des plans indéfinis ou des lamelles présentant des déformations périodiques.

Ces quatre cas sont les suivants : une phase Lβ puis une phase L'γ sont observées avec la lécithine d'oeuf, une phase Lβ' avec les lécithines di C16 et di C18, une phase Pβ' avec les lécithines di C12 et di C14, et enfin une phase Lα et une phase Lβ en démixtion avec la lécithine C10C18. Ces résultats confirment l'observation (LTM) que les diagrammes de phase au dessous de la température Tc, ne sont pas plus compliqués pour des lipides dont la composition en chaînes est hétérogène que pour un composé pur, et en dehors du résultat bien connu que la température de transition des chaînes est d'autant plus basse que les chaînes sont plus courtes et plus insaturées, nous pouvons tenter de dégager un certain nombre de conclusions :

a) - Un point avait été mis clairement en évidence lors de l'étude des lipides de mitochondries. Il ne l'est pas ici mais vaut la peine d'être rappelé. L'hétérogénéité des paraffines peut faire qu'à l'intérieur d'une lamelle, seule une partie des chaînes adopte une conformation ordonnée ; cette fraction devenant de plus en plus importante lorsque la température décroit.

b) - L'hétérogénéité au niveau des paraffines, peut permettre un fractionnement des molécules lipidiques entre deux types de feuillets ou de 1/2 feuillets, ce qui est observé dans la phase Lγ .

c) - En présence d'eau, la seule conformation ordonnée des chaînes observée jusqu'à présent avec des lipides dont la composition en chaînes est hétérogène, (lec C10, C18, lipides d'origine biologique) est de type β,

(C'est à dire, les axes des chaînes sont perpendiculaires au plan du feuillet et organisés dans un réseau hexagonal.).

Il faut remarquer que cette conformation a également été observée avec des membranes entières (Engelmann, 1970 , Gulik et Shechter, 1971).

d) - L'homogénéité de la composition en chaînes paraffiniques entraine une inclinaison des axes des chaînes par rapport à la normale au plan du feuillet. L'angle d'inclinaison dépend de la concentration en eau du système et est indépendant de la température.

Nous avons pu montrer qu'avec les lécithines diC12 et diC14, l'inclinaison des chaînes s'accompagne d'une déformation des éléments de structure. Ceux-ci sont des lamelles présentant des déformations périodiques, la périodicité dépend de la longueur de la chaîne paraffinique et de la concentration en eau du système ; au taux d'hydratation maximum, elle est de 100 Å environ pour la lécithine diC12 et de 200 Å environ pour la lécithine diC14. Ces lamelles sont organisées en réseaux bidimensionnels. Les lécithines à chaînes plus longues ont toujours présenté des réseaux à une dimension, mais la similitude des clichés obtenus par cryodécapage avec les lécithines diC14 et diC16 permet d'affirmer que les éléments de structure sont identiques dans les deux cas. La périodicité des déformations est de 400 Å environ pour la lécithine diC16. Pour préciser dans quelles conditions ce type de déformations des éléments de structure accompagne l'inclinaison des axes des chaînes paraffiniques, il faudrait étudier d'autres séries homologues de lipides synthétiques. Il peut s'agir ici d'un phénomène particulier aux lécithines.

e) - Le rôle de l'hétérogénéité au niveau des chaînes paraffiniques dans le "gonflement" des phases à chaînes rigides est encore mal connu. Un obstacle important à ce type d'étude est que très souvent dans les lipides à chaînes hétérogènes d'origine biologique, la température de transition des chaînes paraffiniques est inférieure à 0°, aussi le système ne peut incorporer qu'une quantité d'eau limitée, pour des concentrations en eau supérieures, l'eau en excès se transforme en glace. D'après les études qui ont pu être faites, les systèmes à chaînes hétégorènes présentent généralement une phase de type β qui n'incorpore que peu d'eau (de l'ordre de 10% env.), et lorsque la concentration en eau augmente, on peut observer une transition de phase ($\beta \rightarrow \gamma$ dans les lec. et les LTM par ex.), alors que les systèmes à chaînes homogènes étudiés jusqu'à présent, présentent des phases de type β' qui incorporent

jusqu'à 25% d'eau environ.

Comme dans une phase de type Lα, l'introduction de charges dans une phase de type Lβ' permet de la faire "gonfler indéfiniment". L'angle d'inclinaison des chaînes demeure alors constant et égal à l'angle d'inclinaison maximum des chaînes dans une phase ne comportant pas de charges.

Néanmoins dans ce domaine, les études ne sont pas assez nombreuses pour permettre de tirer des conclusions nettes quant au rôle de l'hétérogénéité dans le gonflement.

CONCLUSION

Nous allons reprendre brièvement les principaux résultats de cette étude.

Dans le domaine du diagramme de phases où les chaînes paraffiniques sont "liquides" deux nouvelles classes de structures ont été mises en évidence. Dans la première classe les éléments de structure sont des bâtonnets qui peuvent être infiniment longs, organisés dans un réseau hexagonal bidimensionnel, ou de longueur finie, cristallographiquement équivalents, liés trois par trois ou quatre par quatre pour former divers réseaux tridimensionnels.
La structure est de type I si les bâtonnets sont remplis par les chaînes paraffiniques, de type II s'ils sont remplis par l'eau et les têtes polaires.

Une seule phase appartenant à cette classe était connue avant cette étude : la phase hexagonale.

Nous avons pu montrer que la phase cubique observée dans un grand nombre de systèmes lipides-eau, et dans laquelle les éléments de structure étaient supposés être des sphères appartient en fait à la classe en bâtonnets, et nous avons déterminé la structure d'autres phases appartenant à cette classe.

Un exemple d'une seconde classe de structures a été donné, dans laquelle il existe deux sortes d'éléments de structure, des bâtonnets et des sphères.

Au cours de cette étude, nous nous sommes efforcés de mieux définir les hypothèses qui peuvent être utilisées dans l'analyse des structures de tels systèmes. Ainsi, les structures proposées découlent de deux hypothèses, la surface par tête polaire ne peut décroitre lorsque la concentration en eau augmente, et les éléments de structure occupent des positions spéciales du groupe de symétrie.

Les résultats obtenus nous ont permis de préciser ou de développer les relations entre composition chimique et structure. Nous ne rappellerons ici que les conclusions principales :

Dans la région sèche, la classe de structures observée ne dépend que du nombre de chaînes paraffiniques du lipide. Pour les lipides à une chaîne (savons monovalents), les structures observées appartiennent à la classe

lamellaire, pour les lipides à deux chaînes (savons divalents, lipides d'origine biologique), les structures observées appartiennent à la classe en bâtonnets.

Dans la région hydratée, l'ordre de succession des classes de structure observées en fonction de la concentration en eau, dépend du nombre de chaînes paraffiniques, et pour les lipides possédant deux chaînes paraffiniques, de la charge portée par la tête polaire.

Dans le domaine du diagramme de phases où les chaînes paraffiniques sont rigides, l'étude des lécithines nous a permis de mettre en évidence dans la région sèche, de nouvelles organisations des chaînes paraffiniques : une organisation dite "cristalline" à symétrie orthorhombique, et une organisation de type "δ" à symétrie quadratique. Dans ce dernier cas les chaînes paraffiniques sont enroulées en hélice. C'est la première fois qu'une telle conformation des chaînes est observée.

La seule organisation des chaînes observée dans la région hydratée est à symétrie hexagonale, (type β, β'), les chaînes étant ou non inclinées par rapport au plan des lamelles.

L'étude des lécithines nous a également permis dans cette région de caractériser plusieurs comportements différents suivant la composition en chaînes paraffiniques.

Dans la région sèche comme dans la région hydratée nous avons été amenés à déterminer la structure d'un certain nombre de phases nouvelles et nous avons essayé de préciser le degré d'ordre au niveau des têtes polaires dans de telles phases.

Nous avons pu préciser le rôle de la composition en chaînes paraffiniques dans la formation des différentes phases à chaînes rigides. Ici encore, il faut distinguer la région sèche et la région hydratée. Dans la région sèche, celle-ci ne joue pratiquement aucun rôle. Dans la région hydratée, il nous semble que les faits à retenir sont que :

- L'hétérogénéité des chaînes paraffiniques n'est compatible qu'avec une organisation des chaînes perpendiculaires au plan des lamelles.
- L'homogénéité des chaînes paraffiniques, c'est à dire la localisation des groupes CH_3 dans un même plan peut entraîner, avec des lipides possédant deux chaînes paraffiniques, des phénomènes particuliers. Ainsi dans les lécithines, cette homogénéité entraîne une inclinaison des chaînes paraffiniques par rapport au plan des lamelles, et provoque une "ondulation" des lamelles. Lorsque les chaînes contiennent moins de 16 atomes de carbone, ces lamelles

ondulées peuvent s'organiser en réseaux bidimensionnels.

Venons-en maintenant à l'intérêt biologique de tels systèmes. Nous avons particulièrement insisté sur les capacités polymorphiques des lipides. Si ces observations suggèrent que des phénomènes analogues peuvent jouer un rôle dans les changements de propriétés des membranes biologiques, elles tendent également à indiquer le danger de toute extrapolation trop rapide des résultats obtenus dans les systèmes simples tels que les systèmes lipides-eau aux membranes, dans lesquelles les intéractions lipides-protéines jouent certainement un rôle prépondérant.

Aussi l'intérêt des systèmes modèles lipides-eau pour l'étude des membranes est-il autre à notre avis :

- D'une part, ce type d'étude systématique a permis de bien caractériser par rayons X, la plupart des structures "courantes" observées dans les systèmes lipides-eau, ce qui fait qu'actuellement, l'établissement d'un diagramme de phases préalable à toute étude de système modèle lipoprotéique certainement plus proche des membranes que ne le sont les systèmes lipides-eau, est devenu pratiquement une routine.
- D'autre part, nous disposons maintenant d'un grand nombre de systèmes à structure connue, qui ont déjà permis ou peuvent permettre de "calibrer" d'autres techniques, en particulier de tester la sensibilité de sondes (fluorescence, RPE), à la variation de certains paramètres de structure.

BIBLIOGRAPHIE

E. BAER and D. BUCHNEA, Can. J. Biochem. Physiol., 37, 953, (1959)

D. CHAPMAN, J. Chem. Soc., 152, 784, (1958).

D. CHAPMAN, R.M. WILLIAMS and D.D. LADBROOKE, Chem. Phys. of Lipids, 1, 445, (1967).

D. CHAPMAN, in Biological Membranes, Academic Press, London and New York, (1968).

E. CUBERO ROBLES and H. de JONGH, Rec. Trav. Chim., Pays Bas, 86, 762, (1967).

P.F. ELBERS and P.H.J.T. VERVERGAERT, Publication in Press.

D.M. ENGELMAN, J. Mol. Biol., 47, 115, (1970).

K. FONTELL, L. MANDELL and P. EKWALL, Acta Chem. Scand., 22, 3209, (1968)

A. GUINIER, Théorie et technique de la Radiocristallographie, Ed. Dunod, 547, (1964).

T. GULIK-KRZYWICKI, E. RIVAS and V. LUZZATI, J. Mol. Biol., 27, 303, (1967).

T. GULIK-KRZYWICKI, A. TARDIEU and V. LUZZATI, Mol. Crystals and liquid Crystals, 8, 285-291, (1969).

T. GULIK-KRZYWICKI, E. SHECHTER, Résultats non publiés.

G.H. de HAAS and L.L.M. Van DEENEN, in Advances in Lipid Research, Eds. R. PAOLETTI and D. KRITCHEVSKY, Vol. 2, Academic Press, New York, 42, 53-56, (1964).

K. LARSSON, Zeit. Phys. Chem. Neue Folge, 56, 173, (1967).

Y. LEVINE, Ph. D. Thesis, University of London, (1970).

V. LUZZATI, H. MUSTACCHI, A.E. SKOULIOS and F. HUSSON, Acta Crystallographica, 13, 660, (1960).

V. LUZZATI, and F. HUSSON, J. Cell. Biol., 12, 207, (1962).

V. LUZZATI and F. REISS-HUSSON, Nature, Lond., 210, 1351, (1966).

V. LUZZATI and P.A. SPEGT, Nature, Lond., 215, 701, (1967).

V. LUZZATI, in Biological Membranes, Academic Press, London and New York, (1968).

L. MANDELL, K. FONTELL, H. LEHTINEN and P. EKWALL, Acta Polytechnica Scandinavia, Ch. 74, II, (1968).

C. MONTEILHET, Thèse Université de Paris (1971).

A. MULLER, Proc. R. Soc. A., 127, 417, (1932).

P. PINTO DA SILVA, Publication sous presse.

R.P. RAND, Unpublished results (1970), voir l'article.

F. REISS-HUSSON and V. LUZZATI, J. Phys. Chem., 68, 3504, (1964).

F. REISS-HUSSON, J. Mol. Biol., 25, 363, (1967).

E. RIVAS, Unpublished results (1971).

P. de SANTIS, E. GIGLIO, A.M. LIQUORI and A. RIPAMONTI, Journal of Polymer Science, 1, 1383, (1963).

W.S. SINGLETON, M.S. GRAY, M.L. BROWN and J.L. WHITE, J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 53, (1965).

A.E. SKOULIOS, Thèse, Université de Strasbourg, (1959).

A.E. SKOULIOS and V. LUZZATI, Acta Crystallographica, 14, 278, (1961).

D.M. SMALL and M. BOURGES, Mol. Crystals, 1, 541, (1966).

P.A. SPEGT, Thèse, Université de Strasbourg, (1964).

J.M. VINCENT and A.E. SKOULIOS, Acta Crystallographica, 20, 432, (1966a), 20, 441, (1966b), 20, 447, (1966c).

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

PERMIS D'IMPRIMER

Doctorat d'ETAT

Thèse de SCIENCES PHYSIQUES

Nom LARDIEU

Prénoms Annette

Date et lieu de naissance 8 Novembre 1943 à BOULOGNE SUR MER (Pas de Calais)

SUJET :

Thèse : "Etude cristallographique de systèmes lipides-eau"

Vu et approuvé :

Orsay, le 28 Février 1972

Le Vice-Président du Centre d'Orsay :

Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif